

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie
Studijní obor Parazitologie



Bc. Anna Krylová

Využití metody phage display při zkoumání povrchových antigenů *Leishmania mexicana*
The use of phage display to investigate *Leishmania mexicana* surface antigens

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Tatiana Spitzová, Ph.D.

Konzultant: Laura Adrienne André Willen, M.Sc., Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.8.2020

Anna Krylová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce Táně Spitzové za všechny její rady, konzultace, korekce a spolupráci nejen při sepisování této práce, ale během celého magisterského studia. Dále moc děkuji Lauře a Petře. Lucce a Báře děkuji za pomoc při experimentálních infekcích flebotomů. Také bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře hmyzích vektorů za vytvoření přátelské atmosféry a prof. Petru Volfovi za možnost pracovat v jeho laboratoři a podporu tohoto projektu. V neposlední řadě děkuji svým blízkým, kteří mi projevovali velkou podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Leishmania je jednobuněčný parazit obratlovců přenášený krevsajícím hmyzem – flebotomy. U člověka způsobuje onemocnění zvané leishmanióza, které se řadí mezi nejzávažnější opomíjené tropické nemoci.

V části životního cyklu leishmanie probíhající ve flebotomovi je z hlediska úspěšnosti vývoje parazita klíčový moment, kdy se bičíkatá stádia (promastigoti) přichycují na epitel mesenteronu flebotoma. U většiny druhů leishmanií není známo, na který receptor flebotoma se vážou, ani které povrchové antigeny k tomu využívají.

Pomocí metody phage display byly hledány peptidové ligandy promastigotů *Leishmania mexicana*, které mohou hrát v této vazbě roli. Inkubací fágů s promastigoty a selekcí navázaných klonů fágů bylo identifikováno 16 unikátních peptidů. Fluorescenční značení fágů zobrazujících vybrané peptidy naznačilo potenciální místa jejich vazby na receptory leishmanií. Na základě hypotézy, že nalezené peptidy mohou představovat části domnělých receptorů mesenteronu flebotoma, byly provedeny experimenty, kde byli flebotomové infikováni promastigoty, jejichž vazebná místa byla zablokovaná navázanými fágy zobrazujícími dva vybrané peptidy. Intenzita infekce se lišila mezi oběma skupinami infikovaných flebotomů. Nebyla však pozorována statisticky významná odlišnost od kontrolní skupiny. Nepovedlo se sice popsat žádnou molekulu, která by objasňovala princip vazby, ale po optimalizaci by mohl phage display být vhodnou metodou pro další zkoumání této problematiky.

Klíčová slova: phage display, peptidy, *Leishmania mexicana*, povrchové antigeny, ligandy.

Abstract

Leishmania is a protozoan parasite of vertebrates transmitted by the bite of infected phlebotomine sandflies. In humans, it causes a disease called leishmaniasis, which ranks as one of the most serious neglected tropical diseases. In the vectorial part of the life cycle, the crucial moment is when the flagellate forms (promastigotes) attach to the midgut epithelium of the sandfly. For most leishmania species, little is known about which types of phlebotomine receptors and leishmania surface antigens participate in the binding.

Phage display was used to screen for *Leishmania mexicana* peptide ligands which may play a role in such binding. By affinity selection of phages incubated with promastigote cells, 16 unique peptides were identified. Fluorescent labelling of peptide-bearing phages indicated their putative binding sites on the leishmania surface. Based on the hypothesis that the identified peptides may be a part of receptors found in the phlebotomine midgut, experiments were performed where the sandflies were infected with promastigotes whose binding sites were blocked by two different peptide-bearing phages. The extent of the infection was different between the two cases. However, no statistically significant difference from the control group was observed. Despite unsuccessful attempts to identify a molecule that could clarify the phage-leishmania binding, the optimization of the phage display methodology may lead to a successful outcome in the future.

Keywords: phage display, peptides, *Leishmania mexicana*, surface antigens, ligands.

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Literární přehled.....	11
2.1 Životní cyklus rodu <i>Leishmania</i>	11
2.2 Molekulární interakce leishmanií s epitelem mesenteronu flebotoma.....	13
2.2.1 Specifické přenašeči	15
2.2.2 Permisivní přenašeči	18
2.3 Phage display	22
2.3.1 Bakteriofág M13	22
2.3.2 Selektce specifických peptidů – panning	23
2.3.3 Využití phage display v medicíně.....	25
3 Materiál a metody	31
3.1 Kultivace <i>Leishmania mexicana</i>	31
3.2 Kultivace <i>Escherichia coli</i>	32
3.3 Phage display	32
3.3.1 Panning.....	33
3.3.2 Amplifikace.....	34
3.3.3 Titrace	35
3.3.4 Amplifikace klonů.....	36
3.3.5 Purifikace DNA.....	36
3.3.6 Analýza sekvencí	37
3.4 Dot blot	37
3.5 Fluorescenční značení fágů a příprava preparátů.....	38
3.5.1 Fluorescenční značení fágů	38
3.5.2 Fixace leishmanií na mikroskopická sklíčka.....	39
3.5.3 Příprava preparátů a focení	40
3.6 Experimentální infekce flebotomů.....	40
3.6.1 Příprava kuřecích kůží.....	40
3.6.2 Chov <i>Lutzomyia longipalpis</i>	40
3.6.3 Experimentální infekce flebotomů.....	41
3.6.4 Pitvy střev flebotomů	41
3.6.5 Statistické vyhodnocení	42
4 Výsledky	43
4.1 Obohacení eluátu o specificky se vážající klony	43
4.2 Dot blot po třetím panningu	44

4.3 Sekvence klonů	48
4.4 Fluorescenční značení fágů	49
4.5 Experimentální infekce flebotomů	53
5 Diskuze.....	57
6 Závěr	65
7 Seznam použité literatury.....	66

Seznam zkratek

A. – Anopheles

BSA – bovine serum albumin

cDNA – komplementární DNA

DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol

dsDNA – dvouvláknová DNA

E. – Escherichia

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FCS – fetal calf serum

FITC – fluorescein-5-isothiokyanát

GP63 – glykoprotein 63

GPI – glykosylfosfatidylinositol

HRP – horseradish peroxidase

IPTG – isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid

L. – Leishmania

LB – Luria Bertani

LPG – lipofosfoglykan

Lu. – Lutzomyia

P. – Phlebotomus

Pl. – Plasmodium

PEG – polyethylenglykol

PFU – plaque forming units

PG – fosfoglykan

PPG – proteofosfoglykan

ssDNA – jednovláknová DNA

T. – Trypanosoma

TBST – TBS + Tween

WT – wild type

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Úvod

Leishmanióza je onemocnění obratlovců včetně člověka způsobené jednobuněčnými parazity rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Má různé klinické projevy od kožní léze až po závažnou útrobní formu. Podle odhadů ročně onemocní 200 až 400 tisíc lidí útrobní formou a 700 tisíc až 1,2 milionu lidí kožní formou leishmaniózy (Alvar *et al.*, 2012). Stále se tak řadí mezi tři nejzávažnější opomíjené tropické nemoci způsobené prvoky (shrnutí v Fenwick, 2012). Na léky používané proti leishmanióze vzniká rezistence a také je problematická jejich dostupnost. V neposlední řadě jsou preparáty používané k léčbě vysoce toxické a způsobují řadu vedlejších účinků (WHO, 2010).

Přenos leishmanií na člověka je zprostředkován krevsajícím hmyzem – flebotomy (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Leishmanie se ve svém přenašeči množí a vyvíjí do stádií, která jsou infekční pro obratlovce. Existuje několik momentů, které jsou klíčové pro jejich zdárný vývoj. Jedním z nich je přichycení bičíkatých stádií, promastigotů, na střevní epitel přenašeče. Pokud se promastigoti nepřichytí, jsou vyloučeni se zbytky strávené krve a k přenosu nedojde (shrnutí v Dostálová and Volf, 2012).

V posledních letech byla hojně zkoumána role různých povrchových molekul leishmanií, které se přichycení promastigotů mohou účastnit. U některých druhů leishmanií a flebotomů bylo pouze částečně objasněno, které receptory ve střevě flebotoma a které molekuly na povrchu buňky leishmanie jsou v této interakci zahrnuty. Úplnému porozumění procesu přichytávání stále ještě dosaženo nebylo (shrnutí v Dostálová and Volf, 2012).

Phage display je metoda používaná na identifikaci peptidových ligandů cílových molekul. Využívá geneticky upravené bakteriofágy, viry infikující bakterie, které na povrchu kapsidy vystavují cizí peptid. Na základě inkubace knihovny fágů, která obsahuje velké množství různých vystavovaných peptidů, lze selektovat klony specifické pro cílovou molekulu, kterou mohou být peptidy, proteiny, protilátky, buňky atd. Identita vloženého peptidu je poté zjištěna sekvenací DNA fágů. Od objevu phage display v roce 1985 našla tato metoda široké uplatnění v mnoha oblastech biologie a medicíny (shrnutí v Hess and Jewell, 2020; Takakusagi *et al.*, 2020). V případě leishmaniózy phage display vedl k úspěšné selekci peptidových ligandů *Leishmania major*, které inhibovaly interakci parazita s buňkami obratlovčího hostitele (Rhaïem and Houïmel, 2016). Při studování vazby leishmanií na střevo flebotoma phage display zatím využit nebyl. Náplní této

diplomové práce je použit phage display k objasnění vazby leishmanií v mesenteronu flebotoma.

Cíle diplomové práce:

- Využít phage display k hledání peptidů s afinitou k povrchu promastigotů *Leishmania mexicana*.
- Všechny vybrané peptidy identifikovat a otestovat jejich specificitu.
- Otestovat peptidy *in vivo* při laboratorní infekci *Lutzomyia longipalpis*.

2 Literární přehled

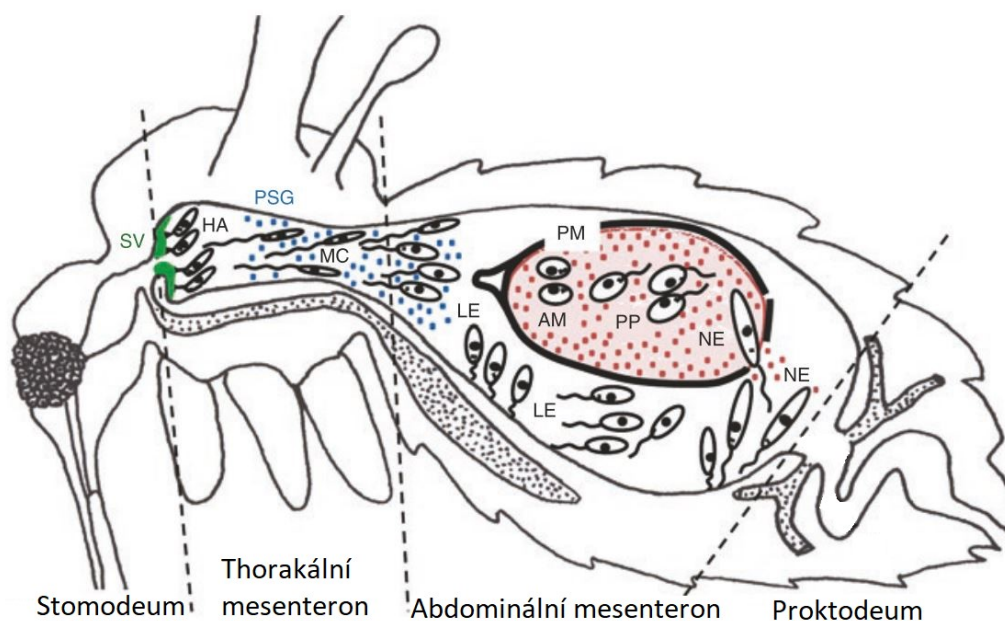
2.1 Životní cyklus rodu *Leishmania*

Leishmania ve svém životním cyklu střídá dva hostitele, flebotoma (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) a obratlovce, včetně člověka. Prokázanými přenašeči lidských leishmanióz jsou dva rody flebotomů: *Phlebotomus* ve Starém světě a *Lutzomyia* v Novém světě. Zatímco ve Starém světě každý druh flebotoma přenáší až na výjimky vždy jen jeden druh leishmanie, v Novém světě pravděpodobně jeden druh flebotoma figuruje jako přenašeč několika různých druhů leishmanií (shrnutí v Maroli *et al.*, 2012). V současnosti rozlišujeme 6-7 komplexů druhů způsobujících lidskou leishmaniózu, které zahrnují asi 21 druhů leishmanií (WHO, 2010; shrnutí v Akhoundi *et al.*, 2017).

Na obratlovčího hostitele jsou leishmanie přeneseny při sání krve infikované samice flebotoma. Infekční stadia leishmanií, metacyklickí promastigoti, vpraveni do rány, jsou fagocytováni savčími makrofágy, neutrofily a monocyty. Promastigoti v obratlovci přežívají ve fagolysosomech makrofágů, kde se přeměňují na amastigoty – malé (2 – 4 μm) nepohyblivé formy bez viditelného bičíku. Když dojde k prasknutí makrofágu v důsledku namnožení amastigotů, uvolnění paraziti infikují nové makrofágy (shrnutí v Séguin and Descoteaux, 2016; Bruschi and Gradoni, 2018).

Ve flebotomovi vývoj leishmanií probíhá v trávicím traktu (viz obr. 1). Většina druhů leishmanií, včetně *Leishmania mexicana* použité v této práci, patří do podrodu *Leishmania* a jejich vývoj v přenašeči se mírně liší od jiných podrodů (např. *Viannia*) (Lainson *et al.*, 1977). Proto se následující text bude týkat pouze podrodu *Leishmania*. Po nasátí na infikovaném obratlovci se do abdominální části mesenteronu s krví dostanou makrofágy obsahující amastigotní formy leishmanií. Změny vnějších podmínek, jako snížení teploty a zvýšení pH, vyvolají transformaci amastigotů na stadia procyklických promastigotů, které se vyznačují špatnou pohyblivostí a mají krátký bičík. Nachází se v endoperitrofickém prostoru obaleni peritrofickou matrix I. typu, která se vytvoří do 4 hodin po nasátí flebotoma. Zde se množí dělením (shrnutí v Kamhawi, 2006; Dostálová and Volf, 2012). Po 48 – 72 hodinách od nasátí krve, kdy se peritrofická matrix rozpadá (Sádlová and Volf, 2009; Pruzinova *et al.*, 2015), se diferencují do delších, dobře pohyblivých, forem promastigotů zvaných nektomonády (Rogers *et al.*, 2002) a unikají z peritrofické matrix do lumen mesenteronu. Aby nebyli vyloučeni flebotomem se zbytky krve, musí se přichytit na epitel mesenteronu vsunutím bičíku mezi mikrokilky (Warburg *et al.*, 1989; shrnutí v Dostálová and Volf, 2012). Poté migrují anteriorním směrem

a transformují se v kratší formy nektomonád, zvaných též leptomonády (Rogers *et al.*, 2002), a opět se dělí. Nakonec se leishmanie přemění na stadia metacyklických promastigotů, která jsou infekční pro obratlovce, a na haptomonády, které se přichytávají na chitinovou výstelku stomodeální valvy (spojení anteriorní části mesenteronu a stomodea), čímž narušují její funkci (shrnutí v Kamhawi, 2006; Dostálová and Volf, 2012). Leishmanie (pravděpodobně stadia nektomonád) navíc v thorakálním mesenteronu tvoří gelovitou zátku z vláknitého proteofosfoglykanu. Flebotomus tak při sání na dalším hostiteli regurgituje do rány infekční metacykly (Rogers *et al.*, 2002; 2004). Přichycení na epitel mesenteronu (Sacks *et al.*, 2000), anteriorní migrace a kolonizace stomodeální valvy jsou nezbytné předpoklady pro úspěšný vývoj leishmanií ve flebotomovi a přenesení na dalšího obratlovčího hostitele (shrnutí v Kamhawi, 2006; Dostálová and Volf, 2012).



Obr. 1: Znázornění životního cyklu podrodu *Leishmania* ve flebotomovi. SV = stomodeální valva, HA = haptomonády, PSG = promastigote secretory gel – gelovitá zátka z vláknitého proteofosfoglykanu, MC = metacykly, LE = leptomonády, NE = nektomonády, AM = amastigoti, PP = procykliční promastigoti, PM = peritrofická matrix. Upraveno dle (Bruschi and Gradoni, 2018).

2.2 Molekulární interakce leishmanií s epitelem mesenteronu flebotoma

Schopnost druhově specifické vazby promastigotů leishmanií na epitel mesenteronu flebotoma je zřejmě hlavním faktorem kompetence přenašečů leishmanií v přírodě (Pimenta *et al.*, 1994; Kamhawi *et al.*, 2004; Dobson *et al.*, 2010). Obecně se předpokládá, že vazba leishmanií v mesenteronu flebotomů je zprostředkováná povrchovými molekulami leishmanií (shrnutí v Ilgoutz and McConville, 2001).

Promastigoti syntetizují mnoho povrchových glykokonjugátů složených z polymerů se základní jednotkou galaktóza-manóza-fosfoglykan, která je konzervovaná u všech druhů. Mezi fosfoglykany se řadí lipofosfoglykan (LPG), který je k membráně přichycený glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou a proteofosfoglykany (PPG), které jsou buď přichycené GPI kotvou, nebo sekretované. Pod těmito makromolekulami je vrstva volných GPI, které se nachází těsně nad cytoplazmatickou membránou parazita – viz obr. 2. Glykokonjugáty také zahrnují molekuly neobsahující fosfoglykan, kam patří i hlavní povrchový glykoprotein GP63. Mezi sekretované proteiny se řadí také kyselé fosfatázy (shrnutí v Kamhawi, 2006).

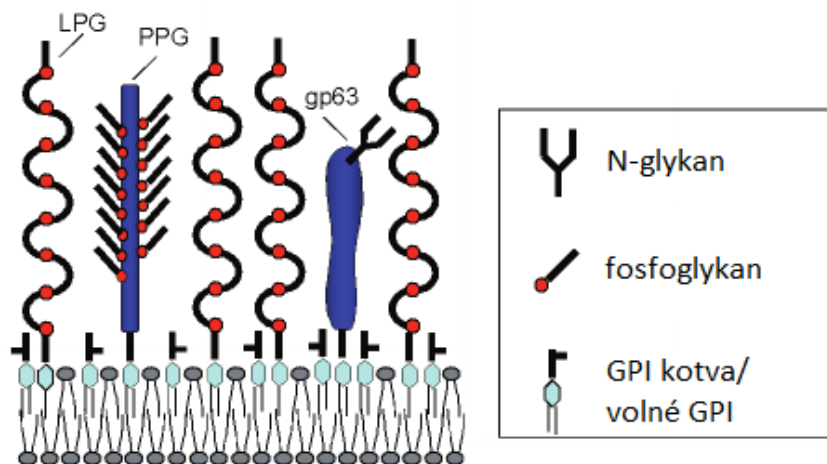
LPG je největším a nejpočetnějším glykokonjugátem promastigotů. Sestává ze struktury složené z opakujících se jednotek fosfodisacharidů, která je přítomna u všech promastigotů leishmanií, a na konci má oligosacharidovou čepičku. Může být modifikovaná glykanovými postranními řetězci. Modifikace struktury LPG postranními řetězci se může lišit v závislosti na stádiu vývoje, kmeni a druhu leishmanie (Pimenta *et al.*, 1994; Soares *et al.*, 2002; Dobson *et al.*, 2010; Volf *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2017).

Membránově vázané PPG se skládají z polypeptidů, na které jsou navázané fosfoglykanové postranní řetězce různé délky. Jsou připojeny přes strukturu obsahující manózu-1-PO₄-serin k oblastem proteinu bohatým na serin (shrnutí v Ilgoutz and McConville, 2001).

Sekretované PPG poskytují leishmaniím ochranu před trávicími enzymy flebotoma při trávení krve. Závisí na nich tedy přežívání parazitů v raném stádiu infekce (Sacks *et al.*, 2000; Boulanger *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2004; Svárovská *et al.*, 2010). Dále tvoří gelovitou zátku v anteriorním mesenteronu flebotoma (Rogers *et al.*, 2002).

GP63 neboli leishmanolysin je 63 kDa protein připojený GPI kotvou exprimovaný u promastigotů všech druhů leishmanií (shrnutí v Kamhawi, 2006). Je na povrchu četnější než membránově vázané PPG (shrnutí v Ilgoutz and McConville, 2001). Má

navíc funkci enzymu – byl charakterizován jako zinková metaloproteináza (Bouvier *et al.*, 1989).



Obr. 2: Povrchové molekuly promastigota rodu *Leishmania*. LPG = lipofosfoglykan, PPG = proteofosfoglykan, gp63 = glykoprotein 63, GPI = glykosylfosfatidylinositol. Upraveno dle (McConville *et al.*, 2002).

Dle laboratorních testů schopnosti přenášet leishmanie *in vivo* lze rozdělit flebotomy na dvě skupiny, tzv. specifické a permissivní přenašeče (shrnutí v Kamhawi, 2006; Volf and Myskova, 2007). U první, menší, skupiny specifických přenašečů byl mechanismus přichytávání leishmanií na epitel střeva více objasněn. Bylo prokázáno, že závisí na LPG (Pimenta *et al.*, 1994; Sacks *et al.*, 2000; Kamhawi *et al.*, 2004; Myskova *et al.*, 2007; Svárovská *et al.*, 2010; Jecna *et al.*, 2013). Mezi specifické přenašeče se řadí *Phlebotomus papatasi* a *Phlebotomus duboscqi* schopni v laboratorních podmínkách přenést pouze *Leishmania major* (Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Pimenta *et al.*, 1994; Svárovská *et al.*, 2010) a *Phlebotomus sergenti* přenášející pouze *Leishmania tropica* (Kamhawi *et al.*, 2000). Nicméně u laboratorně nakažených samic *P. duboscqi* byl jednou zaznamenán i vývoj *L. tropica*. Po defekaci bylo 70 % samic infikovaných a 55 % mělo silnou až velmi silnou infekci (Killick-Kendrick *et al.*, 1994).

Naproti tomu u tzv. permissivních přenašečů, kam spadá většina druhů flebotomů, bylo prokázáno, že se v nich úspěšně vyvíjí celá řada druhů leishmanií. Způsob přichycení leishmanií u této skupiny není zatím objasněn. Typickým permissivním přenašečem je *Lutzomyia longipalpis*, která v laboratorních podmínkách přenáší *L. mexicana* (Rogers *et al.*, 2002) a *L. major* (Myskova *et al.*, 2007). *In vitro* se na mesenteron *Lu. longipalpis* přichytávaly druhy *L. donovani*, *L. major* (Pinto-Da-Silva *et al.*, 2005) a *L. tropica* (Wilson *et al.*, 2010). V přírodě figuruje také jako přenašeč více

druhů leishmanií, například *L. amazonensis* a *L. infantum* (= *chagasi*) (shrnutí v Maroli *et al.*, 2012).

Jelikož však nebyly prostudovány interakce všech druhů, dá se předpokládat, že toto rozdělení není ještě definitivní (Dostálová and Volf, 2012).

2.2.1 Specifictí přenašeči

Nejvíce byla studována interakce druhu *P. papatasi* přenášejícího specificky *L. major* (shrnutí v Dostálová and Volf, 2012). Byla u něj jasně prokázána vazba přes LPG, a navíc byl v mesenteronu *P. papatasi* a *P. duboscqi* objeven i receptor, na který se *L. major* přichycují (Kamhawi *et al.*, 2004). Závislost vazby leishmanií u specifických přenašečů na LPG dokládá řada studií.

U dvojice *P. papatasi* a *L. major* byla prokázána závislost vazby na epitel mesenteronu flebotoma na LPG, konkrétně na postranních řetězcích LPG obsahujících galaktózové zbytky, které se vyskytují pouze u těch stádií, která se přichycují na střevo (Pimenta *et al.*, 1992). Toto bylo potvrzeno i v další studii, kde byla testována vazba leishmanií na vypitvaná střeva *P. papatasi*. *L. major* byly na střevo navázané ve velkém počtu. U *L. major* defektních v LPG byla vazba na střevo slabá. Byla ale použita linie *L. major* vytvořená působením chemického mutagenu (Pimenta *et al.*, 1994), který mohl způsobit i jiné nespecifické změny.

U další mutantní linie *L. major*, specificky deficientní pouze v molekule LPG, byl pozorován stejný výsledek. Paraziti bez LPG nebyli schopni přežít defekaci *P. papatasi*. Když u nich byla obnovena exprese LPG, flebotomové měli srovnatelnou intenzitu infekce jako flebotomové infikované divokým typem (WT) *L. major*. Stejný výsledek byl pozorován při *in vitro* pokusech, kde byly leishmanie inkubovány s vypitvanými střevy flebotoma. Na mesenteron se vázaly jen WT *L. major* a mutantní *L. major* s obnovenou expresí LPG (Sacks *et al.*, 2000). Další mutantní linie *L. major* specificky deficientní LPG – vytvořeny genovou delecí (Späth *et al.*, 2000) – také nebyly schopny přežít v *P. papatasi* při laboratorní infekci flebotoma (Myskova *et al.*, 2007).

Kromě toho byl popsán i lektinový receptor, ke kterému se promastigoti *L. major* specificky přichycují. Bylo zjištěno, že je hojně exprimován na lumenální straně mesenteronu dospělých samic *P. papatasi*. Receptor byl nazván PpGalec a charakterizován jako 35,4 kDa galektin, který obsahuje dvě subdomény s afinitou ke glykokonjugátům obsahujícím β -galaktózu. Byl dále nalezen i u *P. duboscqi*.

Rekombinantní PpGalec (rPpGalec) se navíc specificky vázal na povrch promastigotů *L. major* (Kamhawi *et al.*, 2004).

Funkce PpGalec při vazbě *L. major* byla prokázána testem *in vitro*, kdy byla vypitvaná střeva *P. papatasi* inkubována s protilátkou proti PpGalec a poté s PG odvozenými z LPG procyklických promastigotů *L. major*. Detekce monoklonálními protilátkami proti LPG potvrdila skoro kompletní inhibici vazby PG. Při pokusech *in vivo* flebotomové sáli na krvi obsahující protilátky proti PpGalec a amastigoty *L. major*. Po defekaci nasátých flebotomů byl naměřen 86% pokles parazitů a u poloviny flebotomů byla infekce po defekaci kompletně ztracena. Leishmanie se u 89 % flebotomů nevyvinuly v metacyklické promastigoty infekční pro obratlovce. Tyto výsledky indikují, že PpGalec je nezbytný pro vazbu promastigotů *L. major* (Kamhawi *et al.*, 2004).

Druhy leishmanií, které galaktózu na LPG nemají, se na rekombinantní PpGalec nevázaly. Jednalo se například o promastigoty *L. tropica*, u kterých je nahrazena jinými cukry (glukózou a arabinózou) nebo africký izolát *L. donovani*, který postranní řetězce s galaktózou nemá. Ze sedmi otestovaných flebotomů byla exprese PpGalec potvrzena pouze u dvou – *P. papatasi* a *P. duboscqi*. PpGalec není u *P. sergenti*, *P. argentipes*, *P. perniciosus*, *Lu. longipalpis* ani u *Lu. verrucarum* (Kamhawi *et al.*, 2004). U *Lu. longipalpis* byl v transkriptomu mesenteronu nalezen transkript homologický k jedné doméně galektinu (Jochim *et al.*, 2008), ale je nepravděpodobné, že by fungoval jako součást receptoru pro přichycení leishmanií, protože *Lu. longipalpis* přenáší i druhy leishmanií, které nemají LPG modifikované galaktózou, takže se neočekává, že by jejich LPG byly rozpoznány galektiny flebotoma (shrnutí v Dostálová and Volf, 2012).

Ve studii (Dobson *et al.*, 2010) byla popsána specifická struktura postranních řetězců LPG, která je nutná pro vazbu *L. major* na střevo *P. papatasi* původem z Jordánského údolí. Po testování řady druhů a kmenů leishmanií s různou strukturou LPG bylo potvrzeno, že pro úspěšnou vazbu je třeba přítomnost LPG rozsáhle modifikovaných postranními řetězci ve formě právě jednoho zbytku galaktózy, a tedy že záleží i na délce postranních řetězců (Dobson *et al.*, 2010). Jelikož mutantní *L. donovani* upravená pro expresi optimálně modifikovaného LPG vývoj v *P. papatasi* nedokončila, autoři navrhuji existenci více molekul potřebných pro vazbu v mesenteronu zároveň, podobně jako to bylo navrženo i u *Plasmodium berghei* (Dinglasan *et al.*, 2007).

S těmito závěry souhlasí i pozorování laboratorní infekce *P. papatasi* promastigoty *L. amazonensis*. *L. amazonensis* se v *P. papatasi* nevyvíjela – po jeho defekaci byla infekce ztracena, a to i přes to, že má LPG s galaktózovými zbytky. Autoři

to vysvětlují pravděpodobnou závislostí vazby na střevo flebotoma pomocí jiných molekul (Nogueira *et al.*, 2017).

Nově bylo zjištěno, že na přichytávání leishmanií v mesenteronu *P. papatasi* má podíl i protein bičíku nazvaný FLAG1/SMP1. Tento protein byl izolován z bičíku promastigotů *L. amazonensis*, ale po analýze jeho sekvence se zjistilo, že je vysoce konzervovaný u všech druhů rodu *Leishmania*. Jeho exprese byla potvrzena u procyklických i metacyklických promastigotů *L. major*, *L. infantum* (= *chagasi*) a *L. pifanoi*. Dále byl FLAG1/SMP1 detekován specifickými protilátkami kromě těchto druhů i u *L. amazonensis*, *L. mexicana* a *L. donovani*. Navíc byla u tří vyšetřených druhů potvrzena jeho přítomnost na celé délce bičíku – konkrétně u *L. amazonensis*, *L. infantum* a *L. pifanoi*. Při *in vivo* a *in vitro* experimentech s *Lu. longipalpis* a *L. infantum* nebyl zpozorován žádný efekt protilátek proti FLAG1/SMP1 na úspěšnost přichycení leishmanií na mesenteron. Nicméně u *P. papatasi* infikovaných *L. major* byl pozorován statisticky významný pokles přichycených parazitů na střevo jak *in vitro*, tak při laboratorních infekcích *L. major* předem inkubovanými s protilátkami proti FLAG1/SMP1. Autoři předpokládají, že FLAG1/SMP1 sám o sobě není jediným faktorem umožňujícím vazbu a přežití *L. major* v *P. papatasi*. Mohl by hrát roli v počáteční fázi adheze promastigotů k mikrokřídům mesenteronu, jelikož leishmanie se pohybují bičíkem napřed a bičík je tedy první část buňky, která se s mikrokřídly setkává. Proto se domnívají, že by FLAG1/SMP1 mohl posilovat adhezi parazita přes LPG (Di-Blasi *et al.*, 2015).

Vazba *L. major* pomocí LPG byla také potvrzena u *P. duboscqi*. Mutantní *L. major*, které specificky neexprimovaly LPG, se vyvíjely špatně – pouze 10 % samic flebotomů mělo kolonizovanou stomodeální valvu a jen 25 % flebotomů v sobě mělo parazity po defekaci. Naproti tomu WT *L. major* byly přítomny po defekaci u 92 % flebotomů (Svárovská *et al.*, 2010).

U dalšího specifického flebotoma, *P. sergenti*, byla popsána závislost vazby *L. tropica* na LPG, ale pouze *in vitro*. Purifikované fosfoglykany (PG) z LPG několika druhů leishmanií byly inkubovány s mesenteronem *P. sergenti*. Pouze PG izolované z *L. tropica* se silně vázaly na mesenteron. PG z *L. major* a *L. donovani* se vázaly jen slabě. Vazba PG byla konzistentní s vazbou celých promastigotů *in vitro*. Přichytávání *L. tropica* přes LPG naznačují i výsledky testování *in vivo*. Při laboratorních infekcích *P. sergenti* se jen *L. tropica* byla schopná ve flebotomovi vyvíjet i po jeho defekaci.

L. major a *L. donovani* po defekaci nebyly přítomné u žádného flebotoma (Kamhawi *et al.*, 2000).

2.2.2 Permisivní přenašeči

U permisivních přenašečů dosud nebylo zcela objasněno, které molekuly na povrchu leishmanií a na střevním epitelu flebotomů se účastní vazby leishmanií v mesenteronu. Někteří autoři se domnívají, že na rozdíl od specifických přenašečů bude přichycení leishmanií nezávislé na LPG (Myskova *et al.*, 2007).

S tím je v rozporu pozorování značně oslabeného vývoje LPG deficientních mutantů *L. infantum* v permisivním přenašeči *P. perniciosus*. Byly použity mutantní linie, které byly vytvořeny substitucí genu nezbytného pro tvorbu LPG jiným genem (Späth *et al.*, 2000). Při experimentálních infekcích flebotomů *in vivo* bylo celkově nakažených 50 – 60 % samic, ale silné nákazy a kolonizace stomodeální valvy byly pozorovány jen u méně než 15 % z nich. Také *in vitro* se na mesenteron *P. perniciosus* vázaly mutantní *L. infantum* špatně – bylo navázáno jen 14 % mutantních leishmanií oproti WT kontrole (Jecna *et al.*, 2013). V další studii byl pozorován vliv PG purifikovaných z LPG *L. infantum* na vazbu leishmanie v *Lu. longipalpis*. Inkubace s PG odvozenými z procyklického stadia silně inhibovala navázání procyklických promastigotů *in vitro* (Soares *et al.*, 2002). Závislost vazby na přítomnosti LPG byla také při testech *in vitro* naznačena u *L. mexicana* a *Lu. longipalpis*. Při testování vazby promastigotů dvou forem zároveň – LPG deficientních mutantů a WT *L. mexicana* – se formy bez exprese LPG vázaly ve 3 × menším množství (Jecna *et al.*, 2013).

U mutantní linie *L. donovani* deficientní v LPG a jejího přirozeného přenašeče *P. argentipes* byla také pozorována inhibice vazby na střevo – jak *in vitro* při vazbě na vypitvaná střeva, tak *in vivo* při laboratorních infekcích flebotomů (Sacks *et al.*, 2000). V této studii byl ale použit tzv. R2D2 mutant, který byl vytvořen pomocí mutagenese WT *L. donovani* (King and Turco, 1988), což mohlo vést k dalším nespecifickým změnám, které mohly ovlivnit expresi jiných povrchových molekul. Když byla u R2D2 linie *L. donovani* obnovena exprese LPG, leishmanie stále nebyly schopny úspěšně dokončit svůj vývoj v *P. argentipes*. Oproti WT promastigotům *L. donovani* jich přežilo defekaci flebotoma pouze 10 % (Sacks *et al.*, 2000). Vliv LPG na vazbu k mesenteronu *P. argentipes* byl naznačen i při pokusech *in vitro*. LPG z procyklických promastigotů druhů *L. major*, *L. amazonensis*, *L. infantum* a dvou kmenů *L. donovani* byly inkubovány

s otevřenými mesenterony *P. argentipes*. Po navázání fluorescenčně označené protilátky proti epitopu společnému všem LPG se ukázalo, že na střevo *P. argentipes* se vázaly LPG ze všech druhů leishmanií. Autoři se domnívají, že v mesenteronu *P. argentipes* existuje receptor, na který se leishmanie přichycují částí LPG konzervovanou u všech druhů, jelikož *P. argentipes* je permissivní přenašeč. Při experimentálních infekcích přenesl úspěšně všechny testované druhy (*L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* i *L. amazonensis*) (Pimenta *et al.*, 1994). Také v další studii byla pozorována vazba PG izolovaných z LPG *L. donovani* i *L. tropica* na mesenteron *P. argentipes*. Při experimentální infekci přežila *L. tropica* i *L. donovani* u *P. argentipes* dobře (Kamhawi *et al.*, 2000).

Vývoj nezávislý na LPG byl pozorován u permissivních flebotomů *P. argentipes*, *P. perniciosus*, *P. arabicus* a *Lu. longipalpis* infikovanými *L. major* bez exprese LPG. Po defekaci flebotomů byla infekce srovnatelná s infekcí WT *L. major*. Na rozdíl od jejího přirozeného přenašeče *P. papatasi* se zde LPG na vazbě nepodílí (Myskova *et al.*, 2007; Svárovská *et al.*, 2010).

U *L. amazonensis* byl popsán vývoj nezávislý na struktuře LPG ve flebotomech *Lu. migonei* a *Lu. longipalpis*. Ačkoliv byla u dvou kmenů *L. amazonensis* zjištěna různá struktura LPG, neměla vliv na infekci flebotomů. *L. amazonensis* u *Lu. migonei* i *Lu. longipalpis* přežila defekaci a kolonizovala úspěšně stomodeální valvu (Nogueira *et al.*, 2017).

U *L. mexicana* a *L. amazonensis*, které patří do stejného komplexu druhů (shrnuť v Akhoundi *et al.*, 2017), byl pozorován různý vliv GP63 na přichycení k mesenteronu *Lu. longipalpis*. Není tedy pravidlem, že u příbuzných druhů se uplatňují stejné molekuly. Když byla vypitvaná střeva *Lu. longipalpis* inkubována s mutantní linií *L. mexicana*, které byly upravené, aby neexprimovaly proteiny připojené GPI kotvou včetně GP63, a WT *L. mexicana* zároveň, mutantních leishmanií bylo navázáno o 99 % méně než WT. Naproti tomu, když byla testována mutantní *L. amazonensis*, které chyběl GP63, na střevě bylo navázáno 30 % parazitů bez GP63 a 70 % WT (Jecna *et al.*, 2013).

V další studii byl popsán vliv ošetření promastigotů chelatačními činidly, která by měla zablokovat GP63 (Bouvier *et al.*, 1989; Nogueira de Melo *et al.*, 2001). U dvou – kyseliny ethylendiamintetraoctové a 1,10-fenantrolinu bylo pozorováno snížení počtu navázaných promastigotů *L. infantum* na vypitvaná střeva *Lu. longipalpis* o více než 58 % (Soares *et al.*, 2017).

Na přichytávání promastigotů u kombinací *L. braziliensis*-*Lu. intermedia* a *L. infantum*-*Lu. longipalpis* byl otestován vliv GP63 a PG izolovaných z LPG zároveň.

Leishmanie byly ošetřeny protilátkami proti GP63 a vypitvaná střeva flebotomů byla inkubována s PG. Byla pozorována značná inhibice vazby obou druhů leishmanií. Není ale jasné, jestli inhibici vazby způsobilo zablokování PG ve střevě flebotoma, nebo GP63 na povrchu promastigotů leishmanií (Soares *et al.*, 2017). V jiné studii ale byla inkubována střeva *Lu. intermedia* a *Lu. whitmani* pouze s PG odvozenými z LPG *L. braziliensis* a vedlo to k silné inhibici přichycení procyklických promastigotů *L. braziliensis*. U PG byla také po navázání specifické fluorescenčně značené protilátky pozorována silná vazba na mesenteron obou druhů flebotomů (Soares *et al.*, 2010).

U permisivních flebotomů *Lu. longipalpis*, *P. arabicus*, *P. halapensis*, *P. perniciosus* a *P. argentipes* byly navíc objeveny na lumenální straně mesenteronu glykoproteiny vystavující terminálně N-acetylgalaktosaminové zbytky, zatímco u specifických vektorů *P. papatasi* a *P. sergenti* nalezeny nebyly. Také bylo zjištěno, že glykokonjugáty ze střeva *P. halapensis* obsahující N-acetylgalaktosaminové zbytky se specificky vážou na promastigoty *L. major*. Autoři se domnívají, že tyto glykokonjugáty mohou hrát roli v přichytávání leishmanií v permisivních vektorech. Potenciálními receptory leishmanií jsou proteiny vážající heparin a molekuly lektinového typu (Myskova *et al.*, 2007). Tento glykokonjugát byl v další studii charakterizován u *Lu. longipalpis* jako 45 kDa O-glykoprotein a byl nazván LuloG (Myšková *et al.*, 2016). Odpovídá 19 kDa proteinu s neznámou funkcí z knihovny komplementární DNA (cDNA) střeva *Lu. longipalpis* (Jochim *et al.*, 2008). Rozdíl velikosti je přisuzován jeho vysokému stupni glykosylace. Bylo dále zjištěno, že je podobný mucinu a že je připojený GPI kotvou k membráně enterocytů flebotoma. Byl detekován na lumenální straně střeva dospělých samic flebotoma po celou dobu jejich životního cyklu. Také byla *in vitro* prokázána vazba rekombinantního LuloG na celý povrch i bičík promastigotů *L. major*. Receptorem leishmanie pro LuloG mohou být molekuly lektinového typu s předpokládanou specificitou pro N-acetylgalaktosamin. Autory navržené molekuly leishmanií, kterými by se mohly vázat jsou GP63, GP46, membránově vázaný PPG, proteiny vážající laminin a proteiny vážající heparin. Role LuloG ve vazbě na střevo flebotoma ale prokázána nebyla. Byla provedena experimentální infekce flebotomů *Lu. longipalpis* druhem *L. infantum* a při zablokování proteinu rekombinantním anti-LuloG se vazbě *L. infantum* nezabránilo (Myšková *et al.*, 2016).

V tab. 1 je uveden souhrn nejvýznamnějších poznatků o roli molekul leishmanií v přichytávání na mesenteron permisivních i specifických flebotomů.

Tab. 1: Souhrn nejvýznamnějších poznatků o roli molekul leishmanií v přichytávání na mesenteron flebotoma pro jednotlivé kombinace flebotomus – leishmanie, které byly testovány.

Molekula leishmanií	Vliv na vazbu		Reference	Bez vlivu na vazbu		Reference
	Flebotomus	Leishmanie		Flebotomus	Leishmanie	
LPG	<i>P. papatasi</i>	<i>L. major</i>	Pimenta <i>et al.</i> , 1992	<i>P. argentipes</i>	<i>L. major</i>	Svárovská <i>et al.</i> , 2010
	<i>P. duboscqi</i>	<i>L. major</i>	Svárovská <i>et al.</i> , 2010	<i>P. perniciosus</i>	<i>L. major</i>	Svárovská <i>et al.</i> , 2010
	<i>P. sergenti</i>	<i>L. tropica</i>	Kamhawi <i>et al.</i> , 2000	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. major</i>	Myskova <i>et al.</i> , 2007
	<i>P. perniciosus</i>	<i>L. infantum</i>	Jecna <i>et al.</i> , 2013	<i>P. arabicus</i>	<i>L. major</i>	Myskova <i>et al.</i> , 2007
	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. infantum</i>	Soares <i>et al.</i> , 2002	-	-	-
	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. mexicana</i>	Jecna <i>et al.</i> , 2013	-	-	-
	<i>Lu. whitmani</i>	<i>L. braziliensis</i>	Soares <i>et al.</i> , 2010	-	-	-
	<i>Lu. intermedia</i>	<i>L. braziliensis</i>	Soares <i>et al.</i> , 2010	-	-	-
FLAG1/SMP1	<i>P. papatasi</i>	<i>L. major</i>	Di-Blasi <i>et al.</i> , 2015	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. infantum</i>	Di-Blasi <i>et al.</i> , 2015
Proteiny připojené GPI kotvou	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. mexicana</i>	Jecna <i>et al.</i> , 2013	-	-	-
GP63 & LPG zároveň	<i>Lu. intermedia</i>	<i>L. braziliensis</i>	Soares <i>et al.</i> , 2017	-	-	-
	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. infantum</i>	Soares <i>et al.</i> , 2017	-	-	-
GP63	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. amazonensis</i>	Jecna <i>et al.</i> , 2013	-	-	-
	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. infantum</i>	Soares <i>et al.</i> , 2017	-	-	-

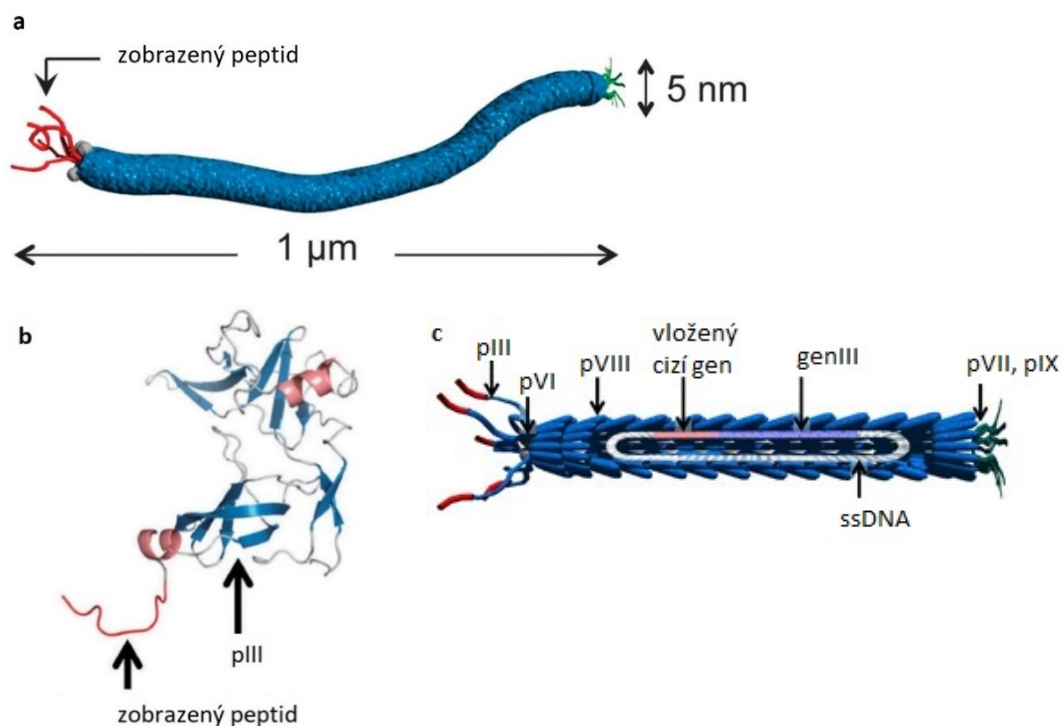
2.3 Phage display

Phage display je metoda používající bakteriofágy jako nástroj k selekci krátkých peptidů s afinitou pro zvolený antigen. Do úseku DNA, který kóduje obalový protein bakteriofága, lze vložit sekvenci kódující krátký peptid a zobrazit ho tak na povrchu virionu (Smith, 1985).

2.3.1 Bakteriofág M13

Nejčastěji se pro phage display používají vláknité fágy s jednoduchou stavbou, zejména fág M13 (shrnutí v Smith and Petrenko, 1997; Pande *et al.*, 2010), které se skládají z jednovláknové DNA (ssDNA) a virové kapsidy – proteinového obalu DNA. Fágy infikují bakterie *Escherichia coli*, do jejichž buněk vstupují cestou přichycení obalového proteinu pIII na vlasovitý výběžek vystavený na povrchu bakterií, zvaný F pilus. Poté bakteriofág využije hostitelskou buňku pro svoji replikaci. Kapsidové proteiny se rozpouští na povrchu buňky a do cytoplazmy vstupuje jen ssDNA fága. S využitím enzymatického aparátu hostitele se syntetizuje komplementární vlákno DNA. Vznikne dvouvláknová DNA (dsDNA), která se replikuje a tvoří profágy a také slouží jako předloha pro transkripci genů fága a syntézu ssDNA. Hotové ssDNA získají kapsidové proteiny z membrány hostitelské bakterie. V průběhu jednoho cyklu buňky se kontinuálně uvolňují stovky nových virionů. Bakterie se přitom neusmrtí, pouze se zpomalí jejich dělení (shrnutí v Smith and Petrenko, 1997).

Kromě obalového proteinu pIII kapsida bakteriofága sestává z několika dalších proteinů. Na jednom konci virionu se nachází protein pVI spolu s pIII a na druhém konci proteiny pVII a pIX – viz obr. 3. Všechny tyto proteiny jsou na virové částici v pěti kopiích a nesou anglický název „minor coat protein“. Nejvíce zastoupeným proteinem je hlavní obalový protein pVIII (major coat protein), který obklopuje ssDNA fága a tvoří 87 % jeho hmoty. Je přítomen v 2700 kopiích a kóduje ho jediný gen fága (shrnutí v Smith and Petrenko, 1997; Sawada, 2017).



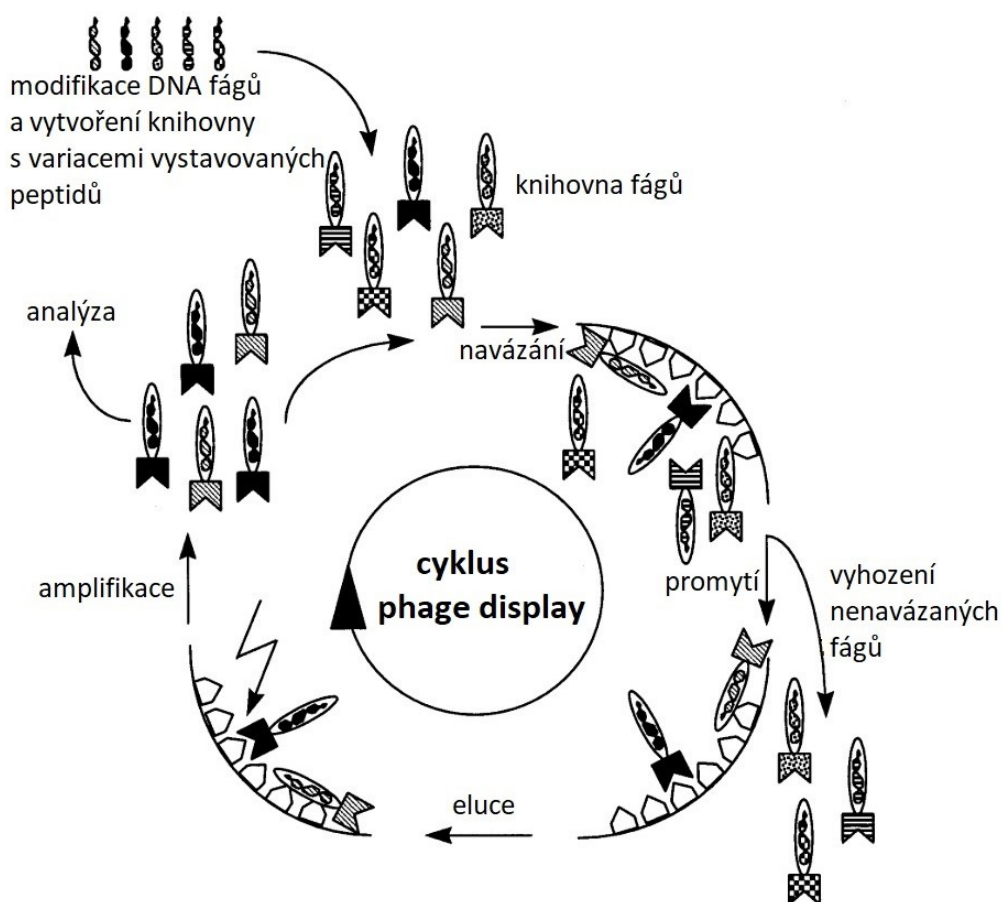
Obr. 3: Bakteriofág M13. **a:** schematické znázornění bakteriofága M13 se zobrazeným cizím peptidem. **b:** obalový protein pIII s vloženým peptidem na N-konci, **c:** schéma znázorňující strukturu bakteriofága M13 – proteiny kapsidy (pIII, pVI, pVII, pIX a pVIII) a ssDNA fága. GenIII kóduje protein pIII, do kterého je vložen cizí gen (červeně), aby se zobrazil na povrchu fága peptid. Upraveno dle Sawada, 2017.

2.3.2 Selektce specifických peptidů – panning

Tzv. fúzní bakteriofág byl zkonstruován tak, že se cizí peptid zobrazuje na povrchu fága jako fúze na jeho N-konci. Původně byl zvolen pro expresi vmezeřeného peptidu obalový protein pIII. Bylo prokázáno, že pokud je vložený peptid dostatečně krátký, funkci proteinu pIII neovlivňuje (Parmley and Smith, 1988; Scott and Smith, 1990). Pro expresi cizích peptidů se nyní využívá i jiných obalových proteinů fága. Často je používán hlavní obalový protein pVIII, jelikož vmezeřený cizí peptid je pak zobrazován na povrchu fága v mnoha kopiích. Je ale možné ho využívat pouze na zobrazení kratších peptidů (shrnutí v Hess and Jewell, 2020).

Z fúzních fágů je možné vytvořit knihovny, heterogenní soubory, které obsahují stovky milionů různých vložených sekvencí v dostatečném množství kopií představujících potenciální epitopy (Scott and Smith, 1990). Po inkubaci s cílovou molekulou (protilátky, enzymy, receptory na povrchu buněk atd.) lze z knihoven fágů vybrat klony fágů zobrazující na svém povrchu peptid, který má k této molekule afinitu a poměrně snadno tak získat její ligandy. Tento postup se nazývá biopanning nebo panning (Parmley and Smith, 1988).

Panning se nejčastěji provádí tak, že se fágy inkubují s imobilizovaným antigenem. Nenavázané klony se odmyjí a specificky navázané klony se eluují pomocí kyselého elučního pufru, který způsobí rozrušení vazeb mezi fágem a antigenem (Parmley and Smith, 1988). Po panningu následuje amplifikace, kde se eluované fágy inkubují s bakteriemi. Fágy infikují bakterie a namnoží se. Pro zvýšení koncentrace specificky se vázajících fágů v eluátu se celý cyklus panning-amplifikace několikrát opakuje (viz obr. 4) (Parmley and Smith, 1988; Scott and Smith, 1990). Aby se zamezilo nespecifickým vazbám fágů, přidává se do promývacích kroků detergent (Parmley and Smith, 1988). Tímto procesem se z epitopové knihovny na povrchu fágů selektují vysoce specifické klony (Scott and Smith, 1990). Po panningu i amplifikaci je vhodné malou část eluátu odebrat a zjistit aktuální počet fágů tzv. titrací. Na agarových plotnách se nechají inkubovat bakterie s fágy naředěnými v ředící řadě a poté se počítají plaky, které fágy na bakteriálním filmu vytvořily. Počet fágů se udává v tzv. plaque forming units (PFU), což je jednotka odpovídající jedné virové částici, která plak vytvořila. Vložený peptid je poté možné identifikovat sekvenací odpovídající oblasti virové DNA vybraných klonů (Parmley and Smith, 1988).



Obr. 4: Schéma cyklu phage display. Upraveno dle Hoogenboom *et al.*, 1998.

2.3.3 Využití phage display v medicíně

Díky tomu, že phage display pracuje s velkým množstvím různých náhodných peptidů exprimovaných na povrchu fágů, je možné objevit řadu nových ligandů, a to i k epitopům, které dosud nebyly známy (Cwirla *et al.*, 1990; Devlin *et al.*, 1990).

V humánní medicíně byla díky phage display nalezena řada protilátek použitých v léčivech. Jsou například v preparátech proti autoimunitním chorobám, jako je adalimumab (Humira®), první lidská monoklonální protilátka používaná proti revmatoidní artritidě, Crohnově chorobě, ulcerózní kolitidě a dalším a belimumab (Benlysta®) proti nemoci systémový lupus erythematosus. Protilátky odvozené z phage display jsou také použity v léku necitumumab (Portrazza®) proti nádoru plic a léčích proti infekčním chorobám, jako je raxibacumab (Abthrax®) proti nemoci anthrax způsobené bakterií *Bacillus anthracis*. Řada dalších je ve stadiu výzkumu (shrnutí v Frenzel *et al.*, 2016).

Výhodou je, že pomocí phage display lze selektovat terapeutické protilátky z knihovny pouze lidských protilátek a tím předejít vedlejším účinkům, které působí polyklonální protilátky ze zvířat (shrnutí v Shim, 2017). Příkladem je izolace dvou peptidů, které se vážou na složku jedu kobry a představují tak potenciální účinný a zároveň bezpečný protijed (Khanongnoi *et al.*, 2018).

Také fágy samy o sobě by bylo možné využít jako nosiče peptidových nebo proteinových vakcín, díky tomu, že vyvolají imunitní reakci a zároveň jsou jen málo toxické. Například u prasat byly použity jako nosiče vakcíny bakteriofágy, které byly inaktivované působením tepla a formaldehydu (Morales *et al.*, 2008). Bezpečnost aplikace fágů savcům je ale ještě potřeba objasnit (shrnutí v Goracci *et al.*, 2020).

Jako alternativa ke konvenčním antibiotikům byla za pomoci metody phage display objevena řada antimikrobiálních peptidů. Peptid, který se s vysokou specificitou váže na *Pseudomonas aeruginosa* byl použit v kombinaci s dalším antimikrobiálním peptidem, který poškozuje integritu membrány mikroorganismů (Kim *et al.*, 2014). Testy *in vitro* se potvrdilo, že kombinace těchto dvou peptidů účinně a specificky působí smrt bakterií. Při testování *in vivo* na myším modelu se ukázalo, že má lepší účinek než standardně využívané antibiotikum meropenem (Kim *et al.*, 2020). Dále byly nalezeny například peptidy s aktivitou proti lidským patogenním bakteriím, které mají afinitu k prekursoru jejich buněčné stěny. Do budoucna by se mohly stát náhradou antibiotik při

léčbě met icilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* a dalších bakterií (Adaligil *et al.*, 2019).

Kromě toho byly objeveny i peptidy s antivirovými vlastnostmi. Peptid proti viru herpes simplex byl účinný i v testech *in vivo* na myších. Ošetření rohovky myši antivirovým peptidem zablokovalo vstup viru do buněk a rozvoj keratitidy (Tiwari *et al.*, 2011).

Phage display se také využívá k mapování epitopů. Například ve studii (Dieltjens *et al.*, 2010) byly použity knihovny fágů vystavujících náhodné heptapeptidy, cyklické heptapeptidy a dodekapeptidy k prozkoumání protilátek HIV-1 (human immunodeficiency virus) pozitivního pacienta. Protilátková odpověď pacienta byla sledována v průběhu 11 let a bylo vybráno 60 klonů fágů s afinitou k IgG protilátkám. Po jejich analýze byly peptidy, které fágy nesly, rozděleny do čtyř skupin podle toho, se kterou částí obalu HIV měly shodné motivy. Tyto poznatky by mohly přispět k vývoji vakcíny proti HIV-1.

Jelikož je díky phage display možné selektovat peptidy s vysokou specificitou pro daný antigen (shrnuto v Sheehan and Marasco, 2015), byl využit i k selekci peptidů použitelných pro detekci patogenů. Například (Williams *et al.*, 2003) identifikovali peptidy, které se vážou s vysokou specificitou na spory *Bacillus anthracis* a (Rao *et al.*, 2013) pomocí phage display objevili peptidy, které specificky rozpoznávají povrch bakterií *Staphylococcus aureus*. Tyto peptidy mohou být fluorescenčně označeny a pomoci tak k detekci těchto bakterií.

V poslední dekádě byl phage display používán spíše na analýzu již známých léků než k objevům nových. To přispělo k odhalení nových funkcí již známých léků a k objasnění jejich farmakodynamiky. Například u artesunátu, léku proti malárii a nematodům, bylo zjištěno i protinádorové působení (shrnuto v Takakusagi *et al.*, 2020) a za použití několika lidských cDNA knihoven zobrazených fágů se přispělo k objasnění mechanismu jeho účinku (Gotsbacher *et al.*, 2019).

2.3.3.1 Využití phage display v parazitologii

Mnoha významných pokroků bylo dosaženo díky phage display také v parazitologii. Uplatnil se například při vývoji vakcíny proti cysticerkóze u prasat (Manoutcharian *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2008) nebo proti kokcidióze drůbeže (Abi-Ghanem *et al.*, 2008). Inkubací knihovny fágů M13 vystavujících náhodné dodekapeptidy

na proteinu pIII byly vybrány klony s afinitou k protilátkám proti povrchovému proteinu *Schistosoma japonicum*. Fágy nesoucí čtyři vybrané peptidy poté byly testovány jako vakcína a poskytly částečnou (34%) ochranu před schistosomózou u myší. Autoři navrhli phage display jako vhodný způsob pro tvorbu vakcín u zvířat proti více antigenům zároveň, jelikož je s fágy jednoduché vytvořit multivalentní vakcínu tím, že se smíchá několik různých klonů (Wu *et al.*, 2006).

Své uplatnění našla metoda phage display i v diagnostice parazitárních infekcí. Knihovny fágů M13 vystavujících náhodné peptidy o délce 15, 30 a 17 aminokyselin byly použity pro selekci peptidů s afinitou k lidským protilátkám proti proteinu skolexu *Taenia solium*. Nalezený peptid je možné dále použít jako antigen k diagnostice lidské neurocysticerkózy s vysokou senzitivitou (Hell *et al.*, 2009). Podobně i u *L. infantum* byly ve dvou studiích pomocí phage display vybrány peptidy z knihovny náhodných peptidů, které jsou s vysokou senzitivitou a specificitou použitelné k diagnostice psí viscerální leishmaniózy (Costa *et al.*, 2014; Toledo-Machado *et al.*, 2015). U *Cryptosporidium parvum* byl pomocí panningu dvou knihoven naivních lidských protilátek vybrán peptid specifický k povrchovému proteinu parazita. Peptid by mohl být vhodný nejen k diagnostice parazita, ale díky tomu, že pochází z knihovny čistě lidských protilátek, i k terapii (Boulter-Bitzer *et al.*, 2010).

V dalším textu se budu podrobněji věnovat několika vybraným studiím, kde byl phage display použit při zkoumání peptidů zahrnutých v interakci parazita s buňkami či tkáněmi hostitele.

U komára *Anopheles gambiae* a jeho parazita rodu *Plasmodium* byla použita tato metoda na selekci peptidů s afinitou ke slinným žlázám a mesenteronu komára, které jsou parazitem využívány pro jeho vývoj. Jelikož autoři předpokládali, že interakce plasmodia a buněk slinných žláz či mesenteronu komárů je specifická, ale nebylo známo, které molekuly se jí účastní, použili k jejímu objasnění knihovnu fágů vystavujících náhodné dodekapeptidy. Selektce specifických fágů probíhala tak, že komáři se nasáli roztoku NaHCO₃ s gama globuliny a NaCl obsahujícího také knihovnu fágů a po 30 minutách po sání byla vypitvána jejich střeva. Při selekci fágů specifických ke slinným žlázám byla knihovna do komára vpravena injekčně. Po čtyřech kolech selektce byl vybrán jeden peptid s afinitou na epitel mesenteronu i slinné žlázy zároveň nazvaný SM1 (salivary gland and midgut peptide 1). Autoři předpokládali, že v obou tkáních se peptid váže na stejný ligand. K sekvenci peptidu nebyl v databázích nalezen žádný homolog (Ghosh *et al.*, 2001).

Schopnost peptidu inhibovat vazbu sporozoitů *Pl. berghei* byla testována na komárovi *Anopheles stephensi*. Tento druh byl vybrán proto, že se na jeho slinné žlázy a mesenteron peptid vázal stejně dobře jako u *A. gambiae*. *A. stephensi* je preferovaný komár pro práci s *Pl. berghei*, protože je k infekci tímto druhem plasmodia vnímavější než *A. gambiae*. Peptid byl smíchán se sporozoity *Pl. berghei* a injikován do samic *A. stephensi*. Po 24 hodinách byl vyhodnocen počet navázaných sporozoitů ve slinných žlázách. Peptid SM1 na rozdíl od nespecifického kontrolního peptidu inhiboval invazi slinných žláz sporozoity o 90 %. Následně byla testována schopnost peptidu ovlivnit vazbu plasmodií v mesenteronu. Samice *A. stephensi* sály na myši infikované *Pl. berghei*, do které byl před sáním komárů injekčně vpraven peptid SM1. Výsledkem bylo, že peptid inhiboval vytvoření oocyst v mesenteronu o 98 – 100 %, pravděpodobně díky tomu, že zamezil invazi mesenteronu ookinetu. Na diferenciaci ookinetů *in vitro* neměl peptid žádný vliv, takže bylo předpokládáno, že zablokoval vazebné místo v mesenteronu, které je využíváno pro přichycení plasmodií. Dále bylo prokázáno, že peptid významně snižuje kompetenci přenašeče přenášet *Plasmodium*. Komáři, kteří sáli na infikované myši, do které byl vpraven peptid, po 25 dnech sáli na neinfikované myši a žádný z nich na ni infekci nepřenese (Ghosh *et al.*, 2001).

Na tyto experimenty bylo navázáno vytvořením transgenní linie komárů *A. stephensi*, kteří tento peptid exprimovali v epitelu mesenteronu. Při devíti pokusech *in vivo*, kdy komáři sáli na myších infikovaných *Pl. berghei*, byl vývoj plasmodia inhibován průměrně o 82 %. Navíc byla významně snížena kompetence transgenních komárů přenášet plasmodia. Ve třech experimentech komáři sáli na infikovaných myších a po 25 dnech sáli na myších, které byly bez infekce. Ve dvou pokusech byl přenos komáry nulový a ve třetím byl více než dvojnásobně snížen. Také výskyt sporozoitů ve slinných žlázách byl menší než u kontrolních komárů. Pokusy ale byly provedeny pouze na menším vzorku komárů (10 – 13 komárů v každém ze tří pokusů). Zajímavé bylo, že transgenní komáři, kteří měli ve slinných žlázách sporozoity, infekci na myši nepřenese. Je možné, že když byly slinné žlázy slabě infikované, sporozoiti nebyli přítomni v lumen a nebyli vyloučeni do rány při sání komára (Ito *et al.*, 2002).

Peptid SM1 byl poté otestován i na komárovi *A. gambiae*. Komáři byli infikováni *Pl. berghei* sáním na infikované myši, do které byl před sáním vpraven peptid SM1. Po pitvách komárů byla pozorována 68 % inhibice vývoje ookinetů. Proto byla dále otestována kombinace dvou různých molekul, peptidu SM1 a protilátky proti střevnímu glykoproteinu *A. gambiae* (*A. gambiae* aminopeptidase N). Dohromady byla inhibice

vývoje ookinetů větší – dosáhla 95 %. Autoři studie usuzují, že obě molekuly rozeznávají jiný ligand v mesenteronu komára, a proto se domnívají, že inhibice ookinetů oběma molekulami se sčítá a dohromady tak blokuje přichycení většiny ookinetů. Zároveň by se neúplná inhibice dala vysvětlit existencí ještě třetí neznámé molekuly, ke které se ookinety mohly přichytit. Pro vazbu ookinetů je zřejmě potřeba více ligandů zároveň. Ve stejné studii byla otestována inhibice vazby ookinetů *Plasmodium falciparum* v komárovi *A. stephensi*. Ačkoliv byla pozorována částečná inhibice peptidem SM1 (až 34 %), rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou nebyl statisticky významný. Role peptidu SM1 při přichycení různých druhů proto zřejmě nebude konzervovaná (Dinglasan *et al.*, 2007).

V další studii byl pomocí knihovny fd fágů vystavujících náhodné peptidy o délce 17 aminokyselin vybrán peptid specifický k epimastigotům *Trypanosoma cruzi* z různých kmenů. Panning byl nejprve opakován $3 \times$ na kmeni Dm28c, počtvrté byl s eluátem proveden panning na epimastigotech z kmene Y. Z vybraných klonů byl identifikován pouze jeden peptid pojmenovaný EPI18. Byla potvrzena jeho specifická vazba na epimastigoty *T. cruzi* kmenů DM28c, G a Y. EPI18 navíc neměl afinitu k promastigotům *Leishmania major* ani k jinému stádiu *T. cruzi* – metacyklickým trypomastigotům. To naznačuje, že se váže na molekulu, která je specifická pro stádium epimastigotů *T. cruzi*. Dále by se tento peptid mohl konjugovat s antimikrobiálními peptidy a mohl by být použit k lokalizaci parazitů ve stadiu epimastigotů v bezobratlém přenašeči *T. cruzi*. Případně by mohl sloužit k označení epimastigotů při experimentech. Při testování homologie sekvence peptidu s proteiny střeva přenašeče byly nalezeny dva proteiny s neznámou funkcí z ploštic *Panstrongylus chinaii* a *Triatoma infestans*. Autoři se domnívají, že tyto proteiny mohou hrát roli v přichycení epimastigotů různých kmenů *T. cruzi* v mesenteronu ploštic (Sáenz-Garcia *et al.*, 2020).

U leishmaniózy byla metoda phage display využita k selekci peptidů, které potlačují infekčnost *Leishmania major* pro savčí buňky. Knihovna bakteriofágů M13 vystavujících na povrchu náhodné hexapeptidy byla inkubována s metacyklickými promastigoty. Panning byl opakován celkem $4 \times$ a z vybraných klonů bylo 42 s nejsilnější afinitou k metacyklickými promastigotům *L. major* sekvenováno. Bylo získáno celkem 6 různých sekvencí peptidů nazvaných P1 – P6, u kterých byla dál testována schopnost inhibovat infekci *L. major*. Metacyklické promastigoty *L. major* byli inkubováni s peptidem a poté byla provedena infekce *in vitro* a *in vivo*. Z 6 testovaných peptidů jeden (P2) silně inhiboval vstup metacyklických promastigotů *L. major* do buněk lidských monocytů *in vitro* (96% ochrana). *In vivo* se testovaly tři vybrané peptidy na myších,

kterým byli paraziti vpraveni injekčně do tlapky. Peptid P2 poskytl úplnou ochranu myši před kožní lézí a šestinásobné snížení počtu parazitů v místě inokulace, slezině a lymfatických uzlinách oproti kontrole (leishmanie bez fágů). V databázích sekvencí proteinů, které by se mohly na metacyklické promastigoty vázat nebyla nalezena žádná homologická sekvence. Po provedení western blotu bylo zjištěno, že fág nesoucí peptid P2 se silně váže na povrchový glykoprotein leishmanií GP63. Zajímavé je, že ne všechny vybrané peptidy působily ochranně proti infekci leishmaniemi, ale všechny fágy nesoucí peptidy P1-P6 vykazovaly pozitivní reakci na rekombinantní GP63. Pomocí molekulárního dokování ale bylo u peptidu P2 nalezeno vazebné místo na GP63 s nejnižší vazebnou energií přímo v aktivním místě GP63. Pro další dva testované peptidy bylo vazebné místo na GP63 předpovězeno na N- nebo C-koncové doméně GP63. Závěrem bylo, že peptid P2 narušuje infekčnost promastigotů tím, že se váže pravděpodobně na velkou část aktivního místa GP63 a předchází tak vazbě promastigotů na hostitelskou buňku. Autoři se dále budou snažit prostudovat peptid P2 jako potenciální inhibitor enzymu GP63, jelikož má potenciál při léčbě kožní leishmaniózy (Rhaiem and Houimel, 2016).

3 Materiál a metody

3.1 Kultivace *Leishmania mexicana*

Pro pokusy byl použit kmen *Leishmania mexicana* M379 MNYC/62/BZ/LV4.

Promastigoti leishmanií byli uchováváni v kryobance v kapalném dusíku v mikrozkuvkách (Thermo Scientific) s kultivačním médiem obsahujícím 10% dimethylsulfoxid (DMSO). Po vyjmutí z kryobanky byly leishmanie neprodleně přeneseny do zkumavek s plochým dnem (Thermo Scientific) s 1,5 ml kultivačního média a dále přechovávány v inkubátoru o stálé teplotě 23 °C. Dvakrát týdně byly po 3 kapkách přeočkovány do nového média. Leishmanie byly pasážovány maximálně desetkrát.

Amastigotní leishmanie byly získány z axenické kultury přeměnou promastigotů (Bates, 1994). Kultivovány byly ve stálých podmínkách ve 33 °C. Kultura byla přeočkována každých 10 dní do nového média (2 – 3 kapky do 1,5 ml média). Nejvyšší použitá pasáž pro pokusy byla 23.

K pokusům byly používány leishmanie (promastigotní i amastigotní) namnožené do koncentrace 10^7 na 1 ml média. Před použitím byla kultura odebrána do mikrozkuvky a třikrát přečištěna sterilním fyziologickým roztokem (0,9% NaCl v dH₂O) a následně centrifugována při 6000 rpm po dobu 5 minut. Po třetí centrifugaci byl pelet leishmanií resuspendován v 1 ml fyziologického roztoku. Koncentrace leishmanií byla určena spočítáním v Bürkerově komůrce (P-lab). Pro počítání bylo z přečištěné kultury odebráno 10 µl do 990 µl ředícího roztoku.

Použité roztoky:

Médium pro promastigotní *L. mexicana*: RPMI-1640 HEPES (Sigma-Aldrich); 10 % fetal calf serum (FCS); 0,1 % amikin 250 mg/ml; 1 % BME vitamíny (Sigma-Aldrich); 0,5 % sterilní moč

Médium pro amastigotní *L. mexicana*: Grace's insect medium (Sigma-Aldrich); 20 % FCS (Sigma-Aldrich); 0,1 % amikin; nourseothricin 50 µg/ml (Sigma-Aldrich); pH 5,4

Ředící roztok: 0,85 % NaCl; 1% formaldehyd

3.2 Kultivace *Escherichia coli*

Kultura *Escherichia coli* ER2738 (New England Biolabs) byla skladována se 100% glycerolem v poměru 1:1 při -80 °C. Pro potřebu pokusů byla rozmražena a rozetřena na LB agarové plotny ošetřené tetracyklinem. Plotny byly přes noc inkubovány ve 37 °C. Druhý den byly plotny přesunuty do 4 °C a skladovány v temnu maximálně 1 měsíc. Při tvorbě tzv. noční kultury byla z plotny odebrána pomocí bakteriologické kličky jedna samostatná kolonie *E. coli* a přenesena do kultivační zkumavky s 10 ml LB média a 200 µl tetracyklinu. Takto byla kultura inkubována přes noc na třepačce při 200 rpm a 37 °C.

Před použitím *E. coli* jako antigenu v testu dot blot byla kultura pročištěna od média. Noční kultura byla centrifugována 5 minut při 3000 × g. Pelet byl resuspendován v 1 ml PBS (Sainathrao *et al.*, 2009). Promytí bylo 2 × zopakováno.

Použité roztoky a materiál:

LB agar: 1 l dH₂O; 20 g LB broth low salt (Sigma-Aldrich); 15 g agar (Sigma-Aldrich)

LB médium: 1 l dH₂O; 20 g LB broth low salt

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄ × 12 H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄

Všechny roztoky byly sterilizovány autoklávováním a skladovány v lednici při 4 °C.

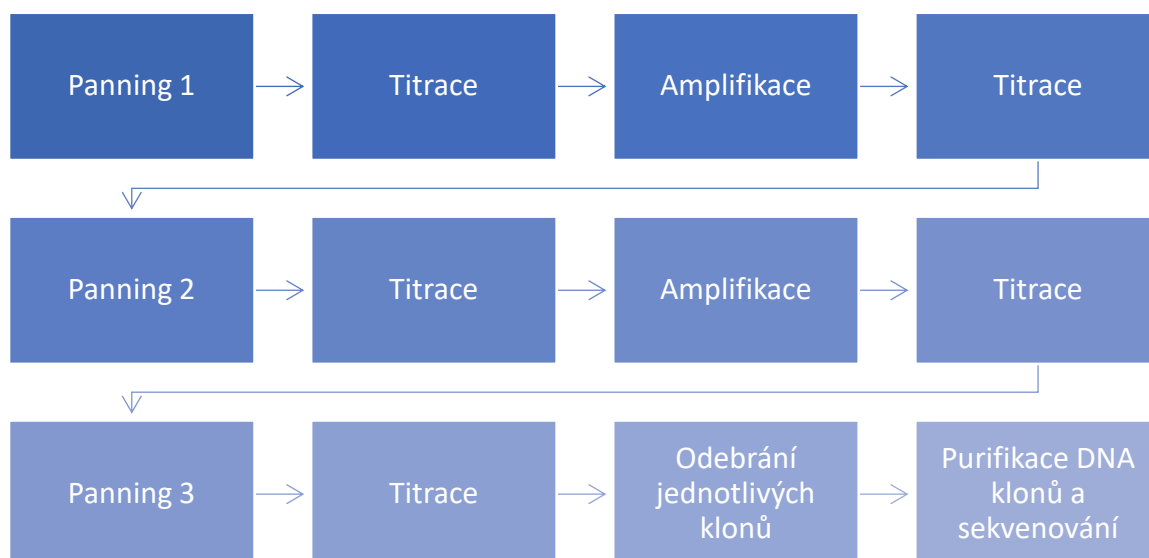
Agarové LB plotny: Plotny byly připraveny vylitím 20 ml horkého LB agaru do každé Petriho misky a ošetřeny 30 minut UV zářením. Poté byly skladovány při 4 °C.

Tetracyklin: 1 mg/ml tetracyklinu v roztoku etanolu a vody v poměru 1:1

Plotny s tetracyklinem: Na plotny předeřáté ve 37 °C bylo naneseno 400 µl tetracyklinu, který byl rozetřen pomocí sterilních skleněných kuliček.

3.3 Phage display

Po dobu všech experimentů s fágy byly dodržovány sterilní podmínky práce, použité roztoky a nádoby byly sterilní a byly používány pipetovací špičky s filtrem. Posloupnost pokusů je schematicky znázorněna na obr. 5.



Obr. 5: Schematické znázornění pokusu phage display.

3.3.1 Panning

Pozitivní selekce klonů s vazbou na antigen (panning) byla provedena ve třech opakováních za účelem vybrání fágů nesoucích peptidy s vysokou specificitou k antigenu. Byla použita knihovna (Ph.D.TM-7 Phage Display Peptide Library, New England Biolabs, USA, E8100S) obsahující přibližně 10^9 různých peptidů exprimovaných na povrchu bakteriofágů M13.

Panning probíhal na polystyrenové 96-jamkové mikrotitrační destičce (Costar 3599). Jamka destičky byla pokryta promastigoty *L. mexicana* ve 150 μ l navazovacího pufru (koncentrace leishmanií: 10^7 /ml, viz kapitulu 3.1) a inkubována přes noc v krabici vyložené navlhčenými ubrousky při 4 °C. Po inkubaci byl roztok odstraněn prudkým otočením destičky směrem dolů a odsátím zbytku tekutiny do papírového kapesníku. Jamka byla následně jednu hodinu blokována blokovacím pufrem (300 μ l). Pufr byl odstraněn stejným způsobem jako předchozí roztok a jamka byla 6 \times promyta TBS s 0,1 % Tween® 20 (Sigma-Aldrich) (TBST). Následně byla do zablokované a promyté jamky nanášena knihovna fágů (10 μ l z knihovny fágů a 90 μ l TBST) o koncentraci 10^{11} PFU/10 μ l (plaque forming units). Inkubace probíhala 30 minut v pokojové teplotě za mírného třepání. Nenavázané fágy byly odstraněny a jamka byla 10 \times promyta TBST (po 300 μ l). Vazby navázaných fágů na leishmanie byly rozvolněny elučním pufrem (100 μ l, inkubace 15 minut). Fágy byly poté přeneseny do mikrozkuhavky a neutralizovány 15 μ l 1M Tris-HCl o pH 9,1. Eluát fágů byl následně použit v dalším

kole panningu. Eluát byl skladován maximálně týden ve 4 °C. Pro dlouhodobé skladování byl naředěn 1:1 sterilním 100% glycerolem a uchováván při -20 °C.

Při druhém a třetím opakování panningu byla zvýšena koncentrace Tween® v TBST na 0,5 %. Vstupní objem fágů byl 10 µl předchozího amplifikovaného eluátu, což odpovídalo koncentraci přibližně 8×10^{10} PFU/10 µl.

Použité roztoky:

Navazovací pufr: 0,1 M NaHCO₃; pH 8,6

Blokovací pufr: 0,1 M NaHCO₃; pH 8,6; 5 mg/ml BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich)

TBS: 50 mM Tris-HCl (Trizma® base, Sigma-Aldrich); pH 7,5; 150 mM NaCl

Neutralizační pufr: 1 M Tris-HCl; pH 9,1

Eluční pufr: 0,2 M Glycin-HCl; pH 2,2; 1 mg/ml BSA

Všechny roztoky byly sterilizovány autoklárováním a uchovávány v lednici při 4 °C. Blokovací pufr byl sterilizován filtrací.

3.3.2 Amplifikace

Před druhým a třetím kolem panningu byl eluát fágů amplifikován, aby se dostatečně navýšil počet klonů.

Noční kultura bakterií (viz kapitolu 3.2) byla $100 \times$ naředěna do 20 ml LB média a inkubována na třepačce při 37 °C a 200 rpm. Při dosažení rané exponenciální fáze růstu kultury ($OD_{600nm} = 0,01 - 0,05$) byl přidán eluát fágů (105 µl). Fágy byly poté 4,5 hodiny inkubovány s *E. coli* na třepačce při 37 °C a 225 rpm. Po skončení inkubace byla kultura přečištěna od bakterií centrifugováním 45 minut při $1820 \times g$ ve 4 °C. Supernatant obsahující fágy byl přenesen do nové zkumavky a 10 minut centrifugován ($1820 \times g$, 4 °C). Horních 80 % supernatantu bylo přeneseno do nové zkumavky a fágy byly vysráženy přidáním 1/6 objemu 20% PEG/NaCl (4 °C, přes noc). Druhý den byly vysrážené fágy centrifugovány při $1820 \times g$ ve 4 °C. Většina supernatantu byla odsáta a fágy byly znovu krátce centrifugovány (10 minut, $1820 \times g$, 4 °C). Pelet fágů byl resuspendován v TBS, přenesen do nové zkumavky a přečištěn od zbylých buněk bakterií centrifugací na 14 000 rpm po dobu 5 minut při 4 °C. Fágy byly následně vysráženy hodinovou inkubací na ledu s 1/6 objemu 20% PEG/NaCl. Poté byly stočeny na 10 minut na 14 000 rpm při 4 °C. Většina supernatantu byla odsáta a fágy znovu stočeny (10 minut,

14 000 rpm, 4 °C). Po stočení byl zbytek supernatantu odsát. Pelet fágů byl resuspendován v 200 µl TBS a přečištěn od případných nečistot centrifugováním na 14000 rpm při 4 °C na 1 minutu a přenesen do nové mikrozkušavky. Amplifikovaný eluát byl následně skladován maximálně tři týdny při 4 °C.

Použité roztoky:

Sterilní 20% polyethylenglykol (PEG, Sigma-Aldrich)/2,5 M NaCl

3.3.3 Titrace

Po každém panningu a amplifikaci byla prováděna titrace pro zjištění koncentrace fágů v eluátu.

Bakterie *E. coli* byly kultivovány přes noc (viz kapitolu 3.2) a následně 100 × zředěny 20 ml LB média a inkubovány ve 37 °C na třepačce při 200 rpm. Po dosažení střední exponenciální fáze růstu ($OD_{600nm} = 0,4 - 0,5$) byla kultura bakterií rozdělena do jednotlivých mikrozkušavek po 200 µl.

Z eluátu fágů bylo odebráno 10 µl a byla připravena ředící řada přenesením 10 µl do následující zkumavky a zředěním 10 × do LB média. Vždy před ředěním byl obsah dobře promíchán vortexováním. Pro neamplifikovaný eluát bylo zvoleno ředění $10^1 - 10^4$ a pro amplifikovaný eluát ředění $10^8 - 10^{11}$. V dalším kroku bylo z každé zkumavky s naředěnými fágy přeneseno 10 µl do odpovídající mikrozkušavky s kulturou *E. coli*. Fágy byly 5 minut při pokojové teplotě inkubovány s bakteriemi. Poté byl celý objem zkumavky smíchán se 3 ml tekutého LB agaru nahřátého na 50 °C (top agar). Top agar spolu s fágy a *E. coli* byl rovnoměrně rozlitý na agarové plotny (předeřáté min. 30 minut při 37 °C) ošetřené IPTG a X-gal. Po zatuhnutí top agaru (cca 5 minut) byly plotny inkubovány přes noc v 37 °C zapečetěné parafilmem. Následujícího dne byly plotny vyjmuty a byla zjištěna koncentrace fágů v 10 µl eluátu na základě spočítání modrých kolonií na plotnách.

Použité roztoky a materiál:

LB top agar: 1 l dH₂O; 20 g LB broth low salt; 7 g agar. Top agar byl skladován při 4 °C a před použitím rozpuštěn do tekuté čiré podoby a uchováván ve vodní lázni při 50 °C.

IPTG a X-gal: 0,05 g/ml isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (Sigma-Aldrich) a 0,04 g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid v dimethylformamidu (Thermo Scientific)

Příprava IPTG a X-gal ploten: Na agarové LB plotny předeřáté 30 minut ve 37 °C bylo rovnoměrně natřeno pomocí sterilních skleněných kuliček 40 μ l IPTG a 20 μ l X-gal ze zásobního roztoku. Po zaschnutí byly plotny zapečetěny parafilmem a skladovány maximálně den před použitím v 37 °C.

3.3.4 Amplifikace klonů

Po třetím kole panningu byl eluát titrován (viz kapitulu 3.3.3). Z agarových LB ploten se samostatnými koloniemi fágů byly odebrány dobře oddělené kolonie. Plotny přitom nesměly být starší než 3 dny a inkubované ve 37 °C více než 18 hodin. Odebrané fágy byly přidány k 1 ml kultury bakterií *E. coli* (noční kultura 100 \times naředěná do LB media) a následně inkubovány 5 hodin na třepačce při 37 °C. Po skončení inkubace byly fágy přečištěny centrifugováním na 14 000 rpm po 30 s. Supernatant byl přesunut do nové mikrozkušavky a opět přečištěn (14 000 rpm, 30 s). Horních 80 % supernatantu bylo přeneseno do čisté mikrozkušavky a naředěno 1:1 sterilním 100% glycerolem. Fágy byly skladovány při -20 °C.

Pro další pokusy byly klony amplifikovány podle postupu v kapitole 2.3.2, ale v případě amplifikace samostatných klonů bylo přidáno k bakteriím pouze 10 μ l fágů. Konečný roztok, ve kterém byly amplifikované fágy resuspendovány, se lišil podle pokusu, na který byly fágy připravovány. Po amplifikaci byly vybrané klony titrovány pro ověření jejich životaschopnosti a koncentrace.

3.3.5 Purifikace DNA

Amplifikované fágy resuspendovány v 200 μ l TBS (koncentrace cca 10^9 - 10^{10} PFU/10 μ l) (viz kapitulu 3.3.4) byly vysráženy inkubací s 200 μ l 20% PEG/NaCl po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Poté byly 10 minut centrifugovány na 14 000 rpm při 4 °C. Většina supernatantu byla odsáta a centrifugace byla zopakována (14 000 rpm, 10 minut, 4 °C). Pelet fágů byl resuspendován ve 100 μ l jodidového pufru a inkubován 15 minut s 290 μ l 96% čistého etanolu při pokojové teplotě. Následně se izolovaná DNA 20 minut centrifugovala na 14 000 rpm při 4 °C. Pelet byl promyt 0,5 ml 70% etanolu a znovu centrifugován (14 000 rpm, 20 minut, 4 °C). Supernatant byl odsát a pelet byl krátce

vysušen ve flow boxu. Poté byl suspendován v 20 µl čisté destilované H₂O. Každý vzorek byl změřen na spektrofotometru Nanodrop ND – 1000 (Thermo Scientific) a odeslán k sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA v Biocevu (Praha). Sekvenace DNA byla provedena pomocí sekvenační sady BrightDye Terminator v3.1 (MCLAB) s následnou purifikací vysrážením v etanolu. Byl využit primer 96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG – 3', New England Biolabs). Kapilární sekvenace byla provedena pomocí analyzátoru ABI3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Po získání sekvencí byly v programu Geneious (Biomatters) vyhledány aminokyselinové sekvence vložených heptapeptidů.

3.3.6 Analýza sekvencí

Sekvence heptapeptidů byly porovnány s knihovnou cDNA střeva *Lutzomyia longipalpis* (Jochim *et al.*, 2008) pomocí algoritmu Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information). U nalezených sekvencí byly sledovány tyto parametry: E-value, Query cover a procentuální shoda sekvencí. Hodnota E-value značí, nakolik je získaný výsledek statisticky významný, roste s velikostí databáze a se zmenšující se délkou sekvencí aminokyselin. Čím má E-value nižší hodnotu, tím je shoda více významná. Hodnota Query cover udává, z kolika % nalezená sekvence aminokyselinových zbytků odpovídá svou délkou hledané sekvenci. Procentuální shoda značí, kolik aminokyselinových zbytků v nalezené sekvenci a jí odpovídající části v hledané sekvenci (viz Query cover) je shodných.

Použité roztoky:

Jodidový pufr: 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 4 M NaI

70% etanol: čerstvě připravený z 99,8% čistého etanolu v deionizované H₂O

3.4 Dot blot

Specifická vazba fágů na antigen, případně jejich nespecifická vazba, byla ověřována pomocí metody dot blot.

Na vystřižená kolečka nitrocelulózové membrány s označenou orientací byly naneseny jako antigen 3 µl (poprvé i 5 µl) promastigotů či amastigotů *L. mexicana* (koncentrace 10⁷/ml) z kultury (promyté 3 × ve fyziologickém roztoku, viz kapitulu 3.1) nebo přečištěné *E. coli* z noční kultury (viz kapitulu 3.2). Při testování nespecifické vazby

bylo na membránu naneseno jako antigen médium pro kultivaci leishmanií a při testování nespecifické vazby fágů přímo na nitrocelulózovou membránu byl nanesen fyziologický roztok. Po zaschnutí byla každá membrána přenesena do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky a 1 hodinu blokována blokovacím roztokem. Poté byla membrána 3 × po 5 minutách promyta promývacím roztokem. Po promytí byly naneseny na každou membránu amplifikované fágy (koncentrace cca $10^9 - 10^{10}$ PFU/10 μ l) ředěné ve sterilním TBS s 0,1 % Tween® (10 μ l fágů a 90 μ l TBST) a byly inkubovány s antigenem 1,5 hodiny na třepačce v pokojové teplotě. Membrána byla 3 × po 5 minutách promyta promývacím roztokem a byla na ni nanesena myší monoklonální protilátka proti fágům M13 konjugovaná s HRP (horseradish peroxidase) (Creative diagnostics) naředěná do koncentrace 0,2 μ g/ml v TBST. Po 1 hodině inkubace s protilátkou byla membrána 2 × po 5 minutách promyta promývacím roztokem a 1 × na 5 minut TBS. Reakce byla vyvolávána přidáním substrátového roztoku až do jejího objevení. Poté byla reakce zastavena promytím membrány 2 × po 5 minutách destilovanou vodou. Membrána byla vysušena, nalepena na papír a naskenována.

Použité roztoky:

Blokovací roztok: 50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5; 0,1% Tween®20 (Sigma-Aldrich); 1% BSA (Sigma-Aldrich)

Promývací roztok: 50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5; 0,1% Tween®20 (Sigma-Aldrich)

Substrátový roztok: 0,5 mg/ml 3,3'-diaminobenzidín (MP Biomedicals); 0,03 % H₂O₂ v TBS

3.5 Fluorescenční značení fágů a příprava preparátů

Vybrané klony fágů byly označeny fluorescenční barvou fluorescein-5-isothiokyanát (FITC, Sigma-Aldrich) a navázány na fixované buňky promastigotů *L. mexicana*, aby se otestovala jejich specifická vazba na leishmanie.

3.5.1 Fluorescenční značení fágů

Amplifikované fágy (viz kapitolu 3.3.4) byly resuspendovány ve 100 μ l 0,3 M NaHCO₃ s FITC (Kelly, Waterman and Weissleder, 2006). Barva byla naředěna na 4 různé koncentrace: 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,0625 mg/ml; 0,03125 mg/ml. Fágy byly

1 hodinu inkubovány ve tmě při pokojové teplotě. Poté bylo k fágům přidáno 900 μ l PBS a fágy byly vysráženy během hodinové inkubace na ledu se 167 μ l 20% PEG/2,5 M NaCl. Následně byly fágy centrifugovány na 14 000 rpm 10 minut při 4 °C. Většina supernatantu byla odsáta a pelet byl znovu centrifugován (14 000 rpm, 10 minut, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 200 μ l PBS a krátce centrifugován (14 000 rpm, 1 minuta) a supernatant byl přesunut do nové mikrozkušavky. Fluorescenčně označené fágy byly skladovány ve tmě při 4 °C nejvýše týden. Životnost a koncentrace fágů byla ověřena titrací (koncentrace byla cca 10^9 PFU/10 μ l) (viz kapitulu 3.3.3).

Použité roztoky:

Sterilní 0,3 M NaHCO₃; pH 8,6

3.5.2 Fixace leishmanií na mikroskopická sklíčka

Pro tento experiment byly zvoleny dva typy fixace:

1. Promastigoti *L. mexicana* z kultury byly přečištěny fyziologickým roztokem (viz kapitolu 3.1) a naneseny v tlusté kapce na mikroskopické podložní sklo. Skla byla ponořena na 5 minut do ledového 96% metanolu a poté na 5 minut do ledového 100% acetonu. Po usušení byla sklíčka skladována při 4 °C.
2. Promastigoti *L. mexicana* z kultury byly přečištěny fyziologickým roztokem (viz kapitolu 3.1), smíchány 1:1 s ledovým paraformaldehydem v PBS (0,04 g/ml) a umístěny na 15 minut na led. Poté byly leishmanie centrifugovány 1 minutu při $4\,500 \times g$ a většina supernatantu byla odsáta. Ke zbytku supernatantu byl přidán ledový PBS a buňky byly znovu promyty ($4\,500 \times g$). Pelet leishmanií byl resuspendován v 1,2 ml ledové H₂O s BSA (0,01 g/ml). Mikroskopické podložní sklo bylo potřeno polylysinem (Sigma-Aldrich) a leishmanie byly naneseny v tlusté kapce. Po zaschnutí byla sklíčka skladována při 4 °C.

Použité roztoky:

4% paraformaldehyd v PBS: do PBS nahřátého na cca 60 °C byl přidán paraformaldehyd a při této teplotě a stálého míchání byl rozpouštěn. Poté byl uchováván při -20 °C.

3.5.3 Příprava preparátů a focení

Sklička s fixovanými promastigoty *L. mexicana* byla pokryta blokovacím roztokem a minimálně 2 hodiny inkubována ve vlhkém prostředí (v krabici s navlhčeným filtračním papírem) při 4 °C. Poté byla zablokována skla 3 × po 3 minutách promyta PBS a byla inkubována 30 minut ve tmě s fágů označenými FITC (viz kapitulu 3.5.1). Po dalším promytí PBS (3 × po 3 minutách) bylo na každé sklo naneseno 17 µl montovacího média Vectashield (Vector Laboratories), které zároveň obsahuje fluorescenční barvu 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI). Na podložní skla byla přiklopena krycí skla a byla zafixovaná lakem na nehty. Po zatuhnutí laku byla skla pozorována mikroskopem (Olympus BX51) a nafocena (Olympus DP70). Nafocené snímky byly editovány v programu ImageJ (úprava kontrastu a jasu a skládání snímků).

Použité roztoky:

Blokovací roztok: želatina 2,5 mg/ml; BSA 2,5 mg/ml; 0,005 % Tween® 20 v PBS

3.6 Experimentální infekce flebotomů

3.6.1 Příprava kuřecích kůží

Kůže z kuřat starých 2 – 3 dny zbavena peří byla sterilně vystřižena a stažena v oblasti hřbetu. Poté byla dvakrát po deseti minutách ponořena do 70% etanolu a dvakrát po deseti minutách do sterilního fyziologického roztoku. Kůže byly skladovány v Petriho miskách obalených parafilmem při -20 °C.

3.6.2 Chov *Lutzomyia longipalpis*

Flebotomové použití pro experimenty pochází z laboratorních chovů prof. Volfa (původ: Brazílie, 1991). Všechna jejich vývojová stadia jsou chována v teplotě 25 – 26 °C a vzdušné vlhkosti 60 – 70 %. Larvy jsou krmeny fermentovanou směsí králíčího krmiva a exkrementů. Jsou uchovávány v krabíčkách se sádrovým dnem v plastové bedně, kde je udržována vlhkost v písku na dně bedny. Dospělci jsou vypouštěni z krabíček do sítě o rozměru 40 × 40 × 40 cm umístěné v plastovém pytli. Dostatečná vlhkost je zajištěna přítomností navlhčené vaty. Mají neomezený přístup k vatě napuštěné 50% cukerným roztokem. Jednou za jejich životní cyklus mají možnost sát krev na uspané myši BALB/c. Po defekaci jsou dospělci přesunuti do navlhčené krabíčky se sádrovým dnem, kde kladou

vajíčka. Mrtvá těla dospělců jsou z kelímků odstraněna a vajíčka zde prodělávají vývoj až do stadia kukly (Volf and Volfova, 2011).

3.6.3 Experimentální infekce flebotomů

Amplifikované fágy o koncentraci přibližně 10^{10} PFU/10 μ l (viz kapitolu 3.3.4) byly resuspendovány ve 200 μ l sterilního fyziologického roztoku. Poté byly 2 hodiny v pokojové teplotě a za mírného třepání inkubovány s promastigoty *L. mexicana* přečištěnými od média ve 300 μ l fyziologického roztoku (koncentrace 10^7 /ml). Po skončení inkubace byly *L. mexicana* s navázanými fágy 10 minut centrifugovány na $500 \times g$ a supernatant byl odsát (Rhaiem and Houimel, 2016). Pelet byl resuspendován ve 300 μ l fyziologického roztoku. Jako kontrola sloužili promastigoti *L. mexicana*, kteří nebyli inkubováni s fágy. Po celou dobu experimentu byly zachovány stejné podmínky pro kontrolu a pokusné vzorky – byly také 2 hodiny na třepačce v pokojové teplotě a poté byly též centrifugovány a resuspendovány ve fyziologickém roztoku.

Defibrinovaná beraní krev byla inaktivována ponořením na 35 minut do vodní lázně o teplotě 56 °C. Pro dosažení infekční dávky leishmanií 10^6 v 1 ml byla kultura leishmanií s fágy nebo bez fágů dále naředěna 2700 μ l krve. Na skleněná krmítka zhotovená pro účel experimentálních infekcí byly nataženy a pomocí parafilmu upevněny membrány z kuřecí kůže. Do trubičky vedoucí k membráně byla vpravena krev obsahující leishmanie inkubované s vybraným klonem fágů (klon 8, klon 16 a leishmanie bez fágů). Krev byla po celou dobu udržována v teplotě 37 °C pomocí vnějšího oběhu vodní lázně. Flebotomové *Lutzomyia longipalpis* staří 4-6 dní byli v síťce připevněni ke krmítku tak, aby k membráně měli přístup, a byli ponecháni dostatečně dlouhou dobu (1,5 hodiny) sát. Při sání byly sítě s flebotomy obalené v plastovém pytli, aby se v nich udržela konstantní vlhkost. Samice, které se nasály, byly poté uchovávány v síti a plastovém pytli v termostatu o teplotě 25 °C. Měly přístup k vatě namočené v 50% cukerném roztoku. Optimální vlhkost v síti byla zajištěna přítomností vaty navlhčené destilovanou vodou.

3.6.4 Pitvy střev flebotomů

Po infekčním sání byla pitvána střeva nasátých samic. Dva dny po infekci bylo vybráno z každé skupiny zhruba 6 samic pro ověření, zda bylo infekční sání úspěšné. Osmý den po infekci byly provedeny pitvy střev cca 30 samic z každé skupiny. Byla pozorována

intenzita a lokalizace infekce. Intenzita infekce se hodnotila čtyřmi stupni: (1) 0 leishmanií ve střevě, (2) 1-100 leishmanií, (3) 100-1000 leishmanií, (4) nad 1000 leishmanií.

Samice flebotomů byly uspány umístěním na led v zakrytém kelímku. Poté byly jednotlivě umístěny do kapky fyziologického roztoku. Pod stereomikroskopem byla pitvacími nástroji (minucie zasazená ve špejli) a pinzetou pitvána jejich střeva. Po vypitvání bylo střevo přeneseno do nové kapky fyziologického roztoku, přikryto krycím sklíčkem, jemně rozmáčkuto a následně pozorováno mikroskopem.

3.6.5 Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena s využitím programu R (<http://cran.r-project.org/>). Intenzita a lokalizace infekce ve střevě flebotomů byly vyhodnoceny pomocí Fisherova exaktního testu. Za statisticky významnou hodnotu bylo považováno $p < 0,05$.

4 Výsledky

4.1 Obohacení eluátu o specificky se vázající klony

Selekce knihovny bakteriofágů na antigen, tedy panning, byla provedena celkem třikrát. Cílem opakovaného panningu bylo vyselektovat klony fágů, které se vysoce specificky vážou na promastigoty *L. mexicana*, tedy zvýšit v eluátu koncentraci fágů specifických pro antigen. Po každém kole selekce se titrací určovala koncentrace fágů v neamplifikovaném eluátu. Taktéž se určovala i před tím, než byly amplifikované fágy použity na další kolo selekce. Před prvním panningem byla koncentrace fágů udána od výrobce ($2 \times 10^{11}/10 \mu\text{l}$). Obohacení eluátu o specificky se vázající fágy bylo vypočítáno jako podíl poměru výstupního a vstupního množství fágů současného kola a předchozího kola. Po druhém kole selekce bylo obohacení $2,8 \times$. Po třetím kole se eluát o specifické klony neobohatil – viz tab. 2.

Tab. 2: Obohacení eluátu fágů po každém kole selekce (panning) o specificky se vázající fágy vyjádřené v PFU (plaque forming units). Udávané hodnoty jsou vztažené k objemu $10 \mu\text{l}$.

Kolo selekce	Vstupní množství fágů (PFU)	Eluované fágy (PFU)	Eluované fágy/vstupní množství fágů	Obohacení
I	2×10^{11}	$3,65 \times 10^4$	$1,82 \times 10^{-7}$	-
II	$8,80 \times 10^{10}$	$4,49 \times 10^4$	$0,51 \times 10^{-6}$	$2,80 \times$
III	$7,25 \times 10^{10}$	$2,95 \times 10^3$	$0,41 \times 10^{-7}$	$0,08 \times$

Po druhém kole panningu byla specifická vazba eluovaných a následně amplifikovaných fágů na promastigoty *L. mexicana* ověřena dot blotem. Promastigoti byli naneseni v 3 a 5 μl k otestování, který objem bude vhodnější. Koncentrace nanášených fágů byla $7,25 \times 10^{10}$ PFU/ $10 \mu\text{l}$. Po vyvolání byla u obou testovaných vzorků vidět barevná reakce indikující fágy navázané na leishmanie. Pro další pokusy s dot blotem bylo rozhodnuto nanášet na membránu 3 μl antigenu, protože i v tomto objemu bylo možné rozeznat dostatečně jasnou barevnou reakci – viz obr. 6.






































Obr. 6: Dot blot po druhém kole selekce. **a:** 3 μl antigenu, **b:** 5 μl antigenu.

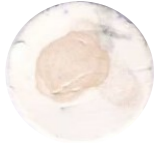












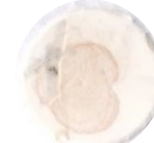





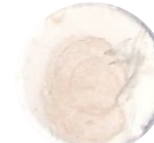










4.2 Dot blot po třetím panningu


















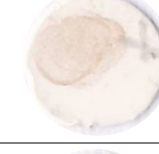




















Po třetím kole selekce bylo z plotny odebráno 29 jasně oddělených kolonií představujících jednotlivé klony fágů. Všechny 29 klonů bylo otestováno na specifickou vazbu na promastigoty a amastigoty *L. mexicana*. Amastigoti byli vybráni pro otestování specifity vazby mezi různými formami leishmanií. Také byly všechny klony otestovány na nespecifickou vazbu na *E. coli*, která byla používána při amplifikaci a titraci fágů. Koncentrace fágů změřená titrací náhodně u pěti klonů byla v rozmezí $0,57 - 1,89 \times 10^{10}$ PFU/10 μ l.

Na základě individuálního zhodnocení intenzity barevné reakce se 66 % (19/29) klonů vázalo na promastigoty *L. mexicana*, 34 % (10/29) klonů se vázalo velmi málo nebo vůbec. Na amastigoty se vázalo 86 % (25/29) klonů. Asi 28 % (8/29) klonů se také slabě vázalo na *E. coli*, vazba na *E. coli* však byla vždy slabší než vazba stejného klonu na leishmanie (viz tab. 3). Osm náhodně vybraných klonů bylo také otestováno na nespecifickou vazbu na médium pro kultivaci leishmanií a na samotnou nitrocelulózovou membránu. Žádný z testovaných klonů se na nitrocelulózovou membránu ani na médium pro leishmanie nevázal (viz tab. 3).

Tab. 3: Dot blot. Všechny klony byly otestovány na antigeny: promastigoti *L. mexicana*, amastigoti *L. mexicana*, *E. coli*. Vybrané klony byly otestovány na nitrocelulózovou membránu (NC membrána) a médium pro kultivaci leishmanií (**médium**). N/A = nedostupná data.

Antigen→ Klon↓	<i>L. mexicana</i> promastigot	<i>L. mexicana</i> amastigot	<i>E. coli</i>	NC membrána	Médium
1				N/A	N/A
2				N/A	N/A
3					
4				N/A	N/A
5					
6				N/A	N/A
7					
8					
9				N/A	N/A

Antigen→ Klon↓	<i>L. mexicana</i> promastigot	<i>L. mexicana</i> amastigot	<i>E. coli</i>	NC membrána	Médium
10				N/A	N/A
11				N/A	N/A
12				N/A	N/A
13				N/A	N/A
14				N/A	N/A
15				N/A	N/A
16				N/A	N/A
17				N/A	N/A
18				N/A	N/A
19				N/A	N/A

Antigen→ Klon↓	<i>L. mexicana</i> promastigot	<i>L. mexicana</i> amastigot	<i>E. coli</i>	NC membrána	Médium
20				N/A	N/A
21					
22					
23				N/A	N/A
24					
25				N/A	N/A
26				N/A	N/A
27				N/A	N/A
28				N/A	N/A
29					

4.3 Sekvence klonů

Za účelem zjistit, které vložené heptapeptidy fágy nesly, byla osekvenována jejich DNA. Z 29 klonů odebraných po třetím kole selekce bylo osekvenováno 28 klonů (klon 25 se nepodařilo osekvenovat). Bylo nalezeno celkem 16 různých vložených heptapeptidů s četností výskytu 3,6 (1/28) – 21,4 % (6/28), viz tab. 4.

Po získání sekvencí byla ohodnocena celková síla vazby peptidů na promastigoty *L. mexicana* podle výsledku testování vazby dot blotem jednotlivých klonů (kap. 4.2). U 50 % (8/16) peptidů byla reakce na promastigoty silná, u 19 % (3/16) slabá a u 31 % (5/16) skoro žádná nebo žádná – viz. tab. 4. Celková síla vazby na amastigoty, ohodnocena stejným způsobem, byla u 63 % (10/16) peptidů silná, u 25 % (4/16) slabá a u 13 % (2/16) skoro žádná nebo žádná.

Za předpokladu, že fágy selektované na povrch *L. mexicana* nesou heptapeptidy, které se mohou nacházet ve střevě flebotoma, byly sekvence peptidů porovnány s knihovnou cDNA střeva *Lu. longipalpis* (Jochim *et al.*, 2008) – viz tab. 4. U 18 % klonů (5/28) nebyla nalezena žádná shoda. Jednalo se o klony 9, 13, 22, 27 a 28. U 69 % (11/16) sekvencí byla nalezena podobná sekvence ze střeva flebotoma, ale žádná podobnost nebyla statisticky významná (s co nejnižší hodnotou E-value) a s dostatečně vysokou hodnotou query cover (aspoň 71 % - 5 ze 7 shodných aminokyselinových zbytků).

Tab. 4: Analýza sekvencí fágů pomocí algoritmu basic local alignment search tool.

Sekvence aminokyselin	Nalezená shoda	E-value	Query cover	Procentuální shoda	Síla vazby*	Číslo klonů
RFPLATS	putative glutathione s-transferase	23	71 %	80 %	+	1, 18, 20, 21
AGVGKSM	midgut chitinase	10	57 %	100 %	+	2, 6, 29
	putative Ras protein	6,7	57 %	100 %		
YSTPLHI	putative galectin	6,7	57 %	75 %	+++	3, 26
RNGHSYV	putative peptidoglycan recognition protein	4,7	57 %	75 %	+++	4, 14, 15, 16, 23, 24
RWVPKTI	putative chymotrypsin	23	85 %	50 %	+++	5
HTHRHYY	putative catalase	0,54	57 %	100 %	+++	7
HNTSPSI	putative chymotrypsin	15	57 %	75 %	+	8

Sekvence aminokyselin	Nalezená shoda	E-value	Query cover	Procentuální shoda	Síla vazby*	Číslo klonů
TKYWRFH	N/A	N/A	N/A	N/A	++	9
KLLNPLA	11.9 kDa midgut protein	1,6	57 %	100 %	++	10, 12
	14.3 kDa midgut protein	15	71 %	80 %		
IHSYTG	putative serine protease	4,7	57 %	75 %	+++	11
LLTTPAK	N/A	N/A	N/A	N/A	+++	13
VSLNATT	14.5 kDa midgut protein	15	100 %	71 %	+	17
TYITNGN	putative actin	15	71 %	80 %	++	19
HWRHKMH	N/A	N/A	N/A	N/A	+++	22
LPPNWFG	N/A	N/A	N/A	N/A	+++	27
LIYMLDH	N/A	N/A	N/A	N/A	+	28

*Síla vazby = síla vazby na promastigoty *L. mexicana* dle reakce na dot blotu. Byla ohodnocena na základě individuálního vnímání intenzity reakce (kap. 4.2). Ohodnocena je třemi stupni: + (žádná nebo skoro žádná reakce), ++ (slabá reakce), +++ (silná reakce). N/A = nedostupná data.

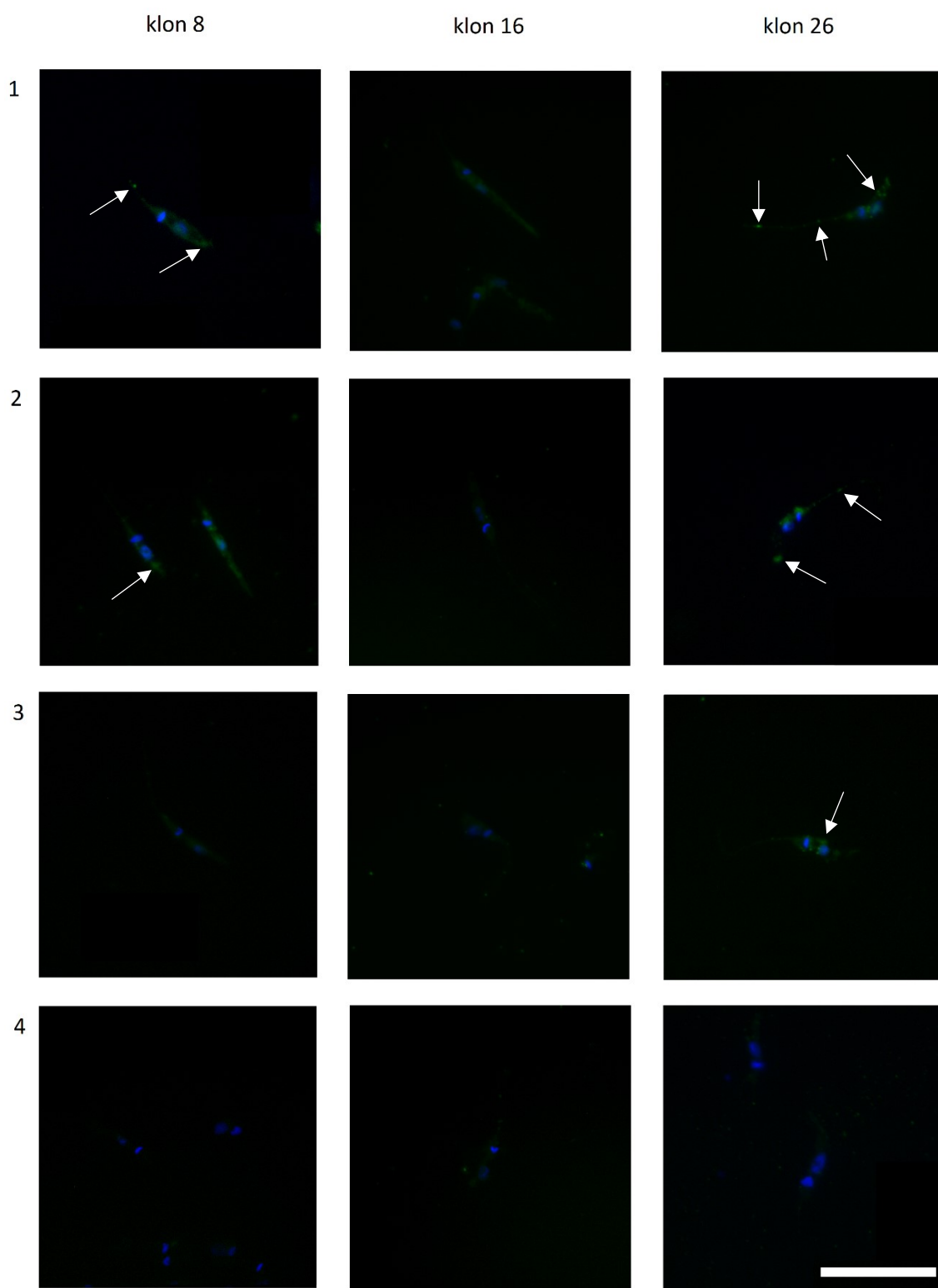
4.4 Fluorescenční značení fágů

Pro fluorescenční značení a následnou přípravu preparátů byly vybrány na základě výsledků z dot blotu 3 klony fágů:

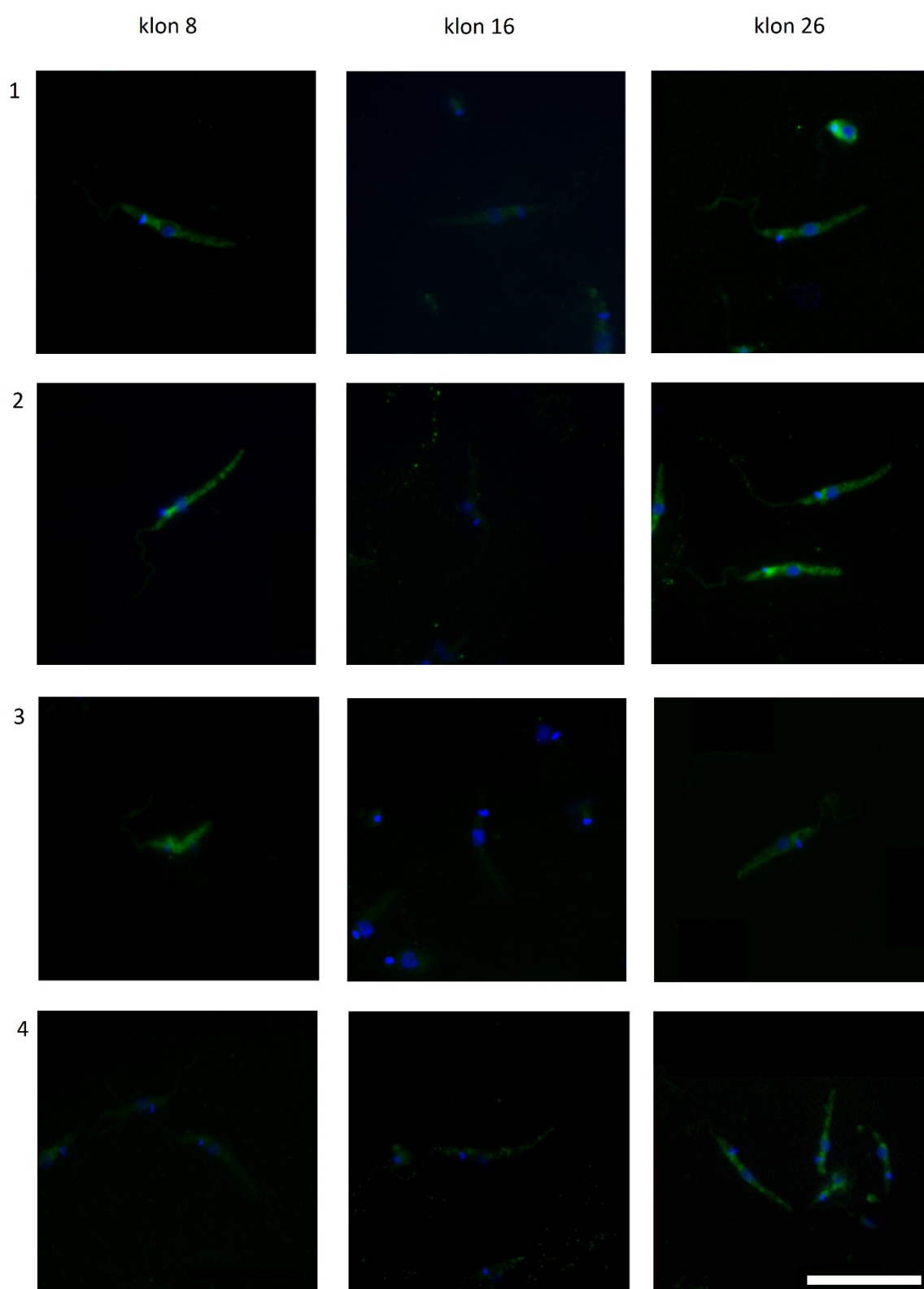
- Klon 8 byl vybrán jako zástupce klonů se slabou vazbou na *L. mexicana* (viz tab. 4).
- Klon 26 jako zástupce klonů se silnou vazbou na *L. mexicana* (viz tab. 4).
- Klon 16 jako zástupce klonů, jejichž sekvence se vyskytovala mezi vybranými klony nejčastěji (6 ×) a také vazba na leishmanie patřila k silnějším (viz tab. 4).

Fágy byly označeny fluorescenční barvou FITC (fluorescein-5-isothiokyanát) ve 4 různých koncentracích (0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,0625 mg/ml; 0,03125 mg/ml) a inkubovány s promastigoty *L. mexicana* fixovanými na sklíčku dvojím způsobem – metanolem s acetonem nebo paraformaldehydem. Preparáty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem a složeny do obrázků – viz obr. 7 a 8. Modrou barvou DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), která se specificky váže na DNA, je obarvené jádro a kinetoplast buňky. Zeleně (FITC) jsou zobrazeny značené fágy. Fixace

paraformaldehydem vykazovala slabší zelený signál než fixace metanolem s acetonem z důvodu, že aceton permeabilizuje buňku a pravděpodobně tak dochází k vazbě zeleně značených fágů na vnitřní antigeny. U obou typů fixace závisela intenzita FITC signálu na ředění. V případě fixace paraformaldehydem bylo možné u klonů 8 a 26 pozorovat body se zvýšenou intenzitou zeleného signálu (vyznačeno šipkami na obr. 7). Mohlo by se jednat o možnou specifickou vazbu značeného fága na promastigoty *L. mexicana*. Tato místa byla pozorována jak na bičíku, tak i na samotné buňce. U fixace metanolem to nebylo možné pozorovat z důvodu silného signálu pozadí. U obou typů fixace byl nejsilnější zelený signál leishmanií s navázaným klonem 26. U leishmanií s klonem 16 byl zelený signál nejméně výrazný.



Obr. 7. Fixace leishmanií paraformaldehydem. Řádek 1 – koncentrace FITC při barvení byla 0,25 mg/ml; řádek 2 – koncentrace FITC: 0,125 mg/ml; řádek 3 – koncentrace FITC: 0,0625 mg/ml; řádek 4 – koncentrace FITC: 0,03125 mg/ml. Měřítka znázorňuje 10 μ m. Šipky ukazují na výrazné zelené oblasti.



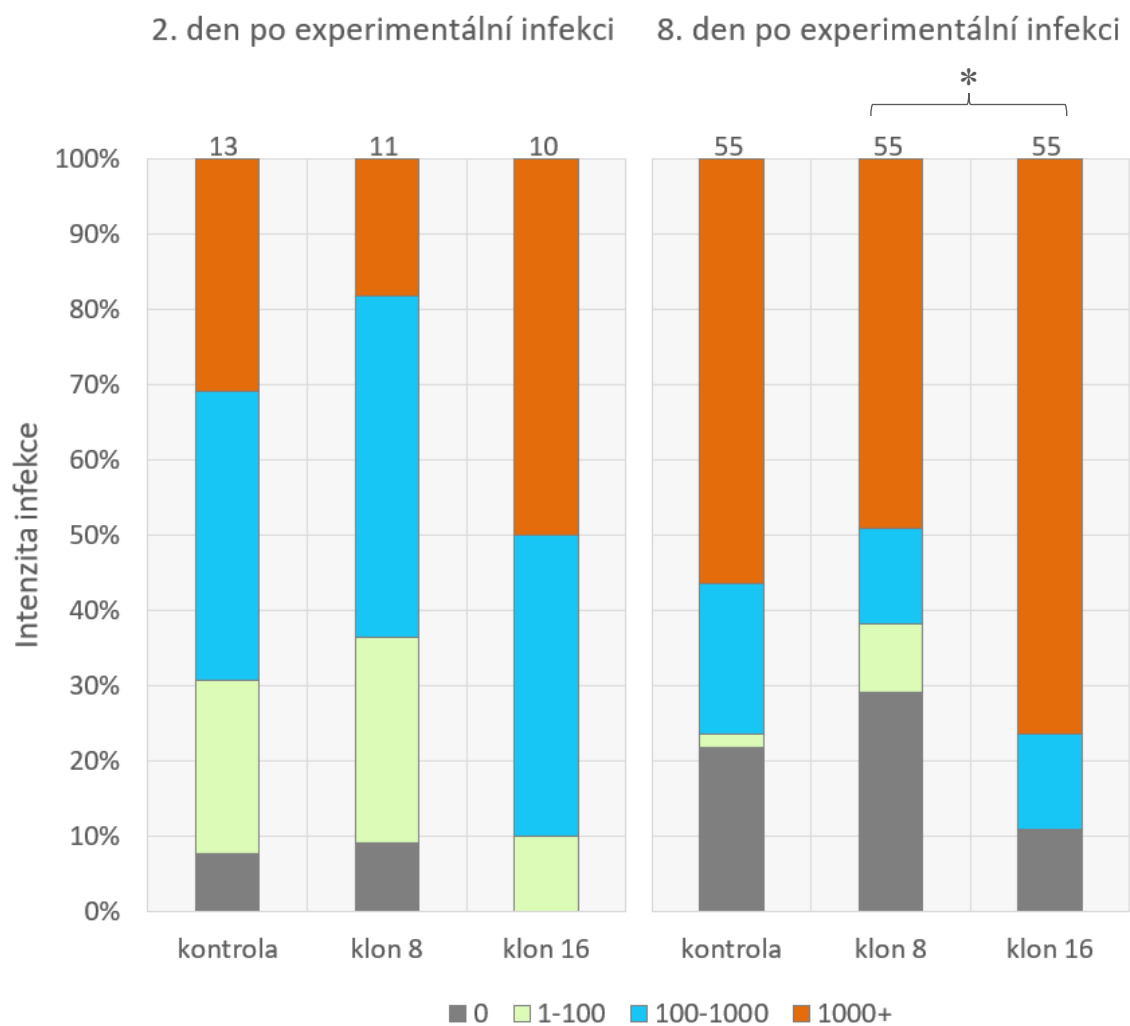
Obr. 8. Fixace leishmanií metanolem a acetonem. Řádek 1 – koncentrace FITC při barvení byla 0,25 mg/ml; řádek 2 – koncentrace FITC: 0,125 mg/ml; řádek 3 – koncentrace FITC: 0,0625 mg/ml; řádek 4 – koncentrace FITC: 0,03125 mg/ml. Měřítka znázorňuje 10 μ m.

4.5 Experimentální infekce flebotomů

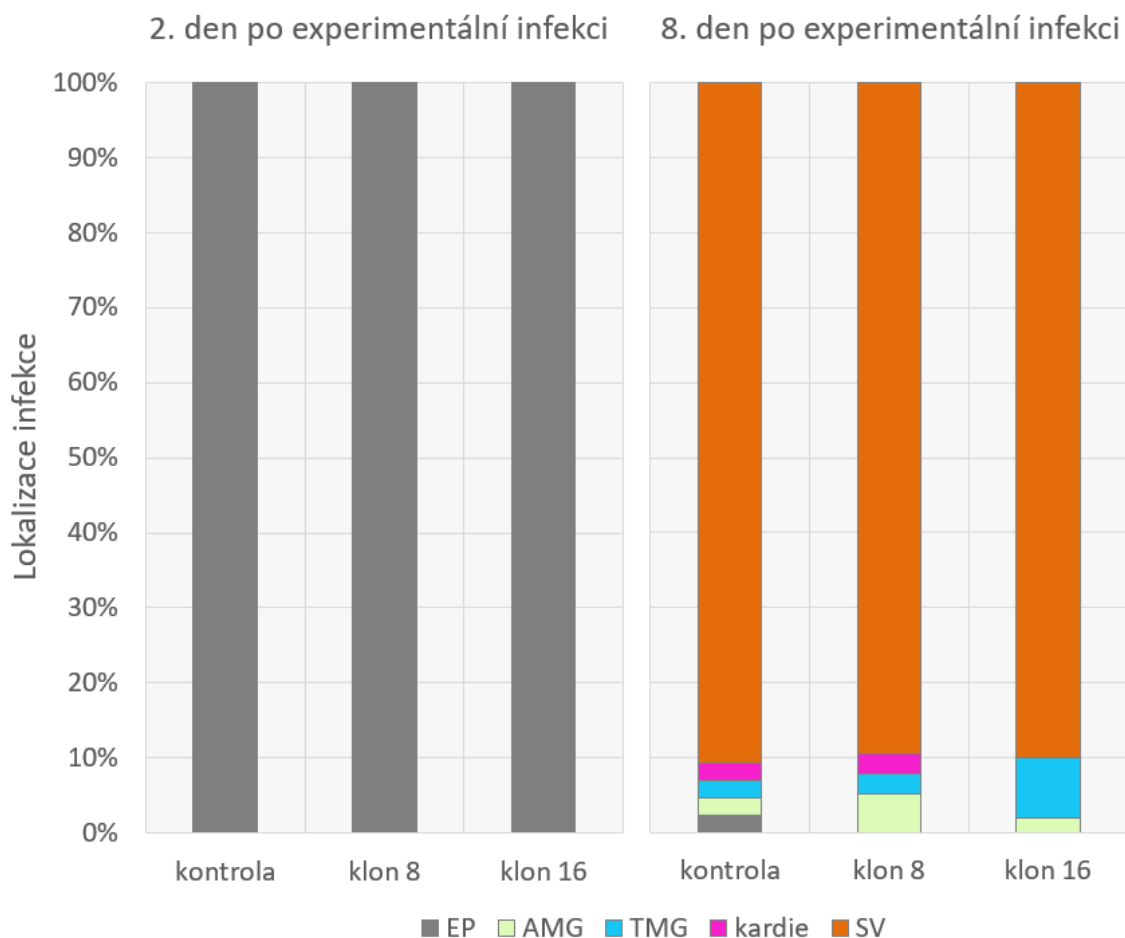
Cílem experimentální infekce flebotomů *Lu. longipalpis* bylo porovnat intenzitu infekce mezi promastigoty *L. mexicana* s navázanými fágů a promastigoty bez fágů. Navázané fágů by měly omezovat vazbu leishmanií na střevo flebotoma a snížit tak intenzitu infekce. Infekce flebotomů byla provedena s klonem 8 a klonem 16 (klon 8 se slabou vazbou na leishmanie a klon 16 se silnější vazbou a největší četností ze všech vybraných klonů – viz tab. 4). Jako pozitivní kontrola byli použiti promastigoti *L. mexicana* bez navázaných fágů. Pokus byl proveden 2 × a výsledky obou pokusů byly spojeny a následně statisticky vyhodnoceny. Oba pokusy byly provedeny shodně.

Infekce flebotomů byly provedeny v den 0. V den 2 byla vypitvána střeva zhruba 6 nasátých samic flebotomů z každé skupiny (klon 8, klon 16, kontrola). Byl hodnocen počet přítomných leishmanií a jejich lokalizace v trávicím traktu flebotomů. Intenzita infekce flebotomů byla bez statisticky významného rozdílu ($p = 0,8115$) – viz obr. 9. U všech skupin byly leishmanie nalezeny v endoperitrofickém prostoru – viz obr. 10.

Osm dní po infekci (den 8) byla vypitvána střeva zhruba 30 nasátých samic z každé skupiny. Intenzita infekce se lišila mezi klonem 8 a 16 ($p = 0,0036$). Kontrola se nelišila od klonu 8 ($p = 0,243$) ani od klonu 16 ($p = 0,114$) – viz obr. 9. Lokalizace leishmanií byla bez statisticky významného rozdílu ($p = 0,5446$). U většiny flebotomů byla hojně kolonizovaná stomodeální valva. U některých leishmanie postoupily jenom do abdominální či thorakální části mesenteronu, případně byly nalezeny v oblasti kardie, která se nachází těsně u stomodeální valvy – viz obr. 10.

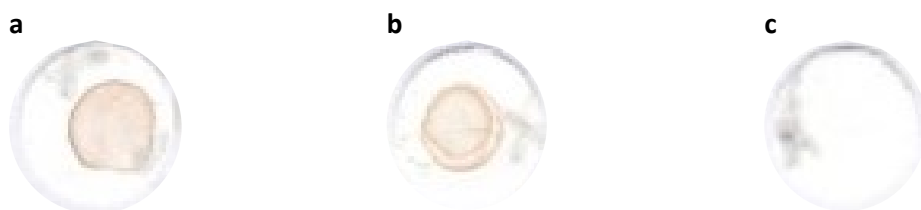


Obr. 9: Intenzita infekce flebotomů leishmaniemi pitvaných 2 dny a 8 dní po jejich experimentální infekci. Čísla nad sloupci ukazují počet vypitvaných střev. Intenzita byla hodnocena čtyřmi stupni: 0 leishmanií (bez infekce), 1-100 leishmanií, 100-1000 leishmanií a víc než 1000 leishmanií ve střevě pitvaného flebotoma. Hvězdičkou jsou označeny skupiny se statisticky významným rozdílem.



Obr. 10: Lokalizace infekce ve střevě flebotomů pitvaných 2 a 8 dní po provedení experimentální infekce. U každého infikovaného flebotoma byla zaznamenána lokalizace leishmanií. Vysvětlivky: EP = endoperitrofitický prostor; AMG = abdominální mesenteron; TMG = abdominální mesenteron + thorakální mesenteron; kardie = abdominální mesenteron + thorakální mesenteron + kardie; SV = kolonizovaná stomodeální valva + thorakální mesenteron + abdominální mesenteron.

Současně bylo při druhém opakování pokusu testováno pomocí dot blotu, zda jsou fágy navázané na leishmanie ve vzorku přítomny. Příprava na samotnou experimentální infekci flebotomů zahrnovala inkubaci leishmanií s fágy a následně byl vzorek centrifugován a sediment leishmanií byl resuspendován ve fyziologickém roztoku. Po těchto krocích – tedy těsně před smícháním leishmanií s krví, bylo ověřeno dot blotem, zda jsou ve vzorku stále přítomny navázané fágy. Ze vzorku byly odebrány 3 μ l, které byly nanесeny jako antigen na membránu. Po zablokování byla přidána protilátka proti fágům. Reakce byla u obou klonů pozitivní a u kontroly negativní – viz obr. 11.



Obr. 11: Dot blot před druhou experimentální infekcí flebotomů. **a:** *L. mexicana* s klonem 8, **b:** *L. mexicana* s klonem 16, **c:** kontrola – *L. mexicana* bez fágů.

5 Diskuze

Phage display je metoda sloužící k izolaci peptidových ligandů různých molekul. Od jejího popsání v roce 1985 (Smith, 1985) je stále široce používána a vedla již k řadě významných objevů (shrnutí v Hess and Jewell, 2020). Její úspěch také spočívá v tom, že na rozdíl od konkurenčních metod, využívajících místo bakteriofágů kvasinky či bakterie, pracuje s velkou diverzitou vystavených peptidů. Zároveň je efektivní pro selekci peptidů s vysokou afinitou pro požadovanou molekulu (Lunder *et al.*, 2005; shrnutí v Sheehan and Marasco, 2015; Park, 2020). Její nevýhodou je naproti tomu nesnadná kultivace fágů a vysoká náchylnost ke kontaminaci fágy z prostředí. Také má komplikovaný protokol, sestávající z inkubace knihovny fágů nesoucích peptidy s cílovou molekulou (panning) a následné amplifikace vybraných specifických klonů infikováním bakterií. Pro určení koncentrace fágů se provádí titrace, kdy se fágy inkubují s bakteriemi, což je poměrně časově náročný postup ve srovnání např. s turbidimetrií, které se využívá při měření koncentrace bakterií (shrnutí v Lunder *et al.*, 2005).

Identifikace peptidových ligandů je možná i metodami *in silico*. Pomocí algoritmů generujících náhodné sekvence peptidů a prací s databázemi bylo již identifikováno několik peptidů. Nicméně stále jsou situace, kdy je panning nenahraditelným. Struktura a přístupnost vazebného místa peptidu je *in vivo* ovlivněna vnějšími podmínkami jako je pH, koncentrace iontů nebo redukční prostředí. Tyto faktory se *in silico* nedají dobře předpovídat (shrnutí v Scodeller and Asciutto, 2020).

V této diplomové práci byl použit phage display s cílem objasnit vazbu leishmanií v mesenteronu flebotoma. Vazba leishmanií v časně fázi vývoje ve flebotomovi je v současné době hojně zkoumána, protože je to jeden z předpokladů úspěšného přenosu parazita na další hostitele. Byla studována řada molekul, které by mohly být ve vazbě zahrnuty, ale zatím tento proces nebyl dostatečně popsán (shrnutí v Dostálová and Volf, 2012). Phage display v tomto ohledu doposud využit nebyl. V podobném případě, u plasmodia a komára, ale vedl k izolaci peptidu blokujícího interakci plasmodia s mesenteronem komára a přerušil tak výrazně jeho přenos (Ghosh *et al.*, 2001).

Úspěšnost selekce knihovny fágů na požadovaný antigen se hodnotí mimo jiné na základě výpočtu obohacení knihovny o specificky se vážající klony. Tato hodnota by se měla po každém kole panningu zvyšovat, jelikož před panningem je v eluátu menší koncentrace specifických klonů než po něm (shrnutí v Bakhshinejad *et al.*, 2016). Při

každém kole cyklu panning-amplifikace dochází ale kromě selekce klonů specifických pro antigen také částečně k selekci klonů, které se dobře množí a dobře infikují bakterie při amplifikaci ('T Hoen *et al.*, 2012). Výhoda v množení některých klonů může být dána mutací v genomu fága, nebo povahou vloženého peptidu (shrnutí ve Vodnik *et al.*, 2011). Podle protokolu (New England Biolabs, 2017) pro selekci specifických klonů stačí 2-3 kola panningu a amplifikace. Více než 4 kola už zvyšují počet specifických klonů pouze částečně, zároveň ale snižují diverzitu klonů (Abi-Ghanem *et al.*, 2008; shrnutí v Derda *et al.*, 2011).

V této diplomové práci byla provedena tři kola panningu s následnou amplifikací selektovaných fágů. Obohacení bylo měřeno titrací fágů před a po každém panningu. Po druhém kole panningu bylo obohacení v porovnání s dalšími studiemi (Abi-Ghanem *et al.*, 2008; Houimel and Mazzucchelli, 2012; Rhaïem and Houimel, 2016) nižší – pouze $2,8 \times$. V řadě studií ale není obohacení vůbec uvedeno (Kelly *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2020). Po třetím kole se eluát už neobohatil. Díky tomu, že bylo po druhém kole selekce amplifikovaný eluát potřeba uchovat do dalšího kola na déle než tři týdny, bylo nutné ho naředit glycerolem pro skladování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro další pokusy se musel eluát znovu amplifikovat. Proto je možné, že opětovná amplifikace způsobila zvýšení podílu klonů, které se lépe množí, na úkor klonů, které mohly být specifické k leishmaniím, ale mohly nést určitou nevýhodu v množení, například se množit pomaleji než ostatní klony, jako to bylo popsáno v ('T Hoen *et al.*, 2012). (Matochko *et al.*, 2012) navrhli řešení tohoto problému použitím zvláštního typu amplifikace, kdy se fágy inkubují odděleně v jednotlivých kapkách média s dostatkem hostitelských bakterií. Tím se předejde problému nerovnoměrného množení všech klonů.

Po druhém panningu byl proveden test specifity vazby eluátu fágů dot blotem, který potvrdil, že se eluát váže na promastigoty *L. mexicana*. Proto se pokračovalo dalším kolem selekce.

Z eluátu po třetím panningu byly titrací a amplifikací izolovány jednotlivé klony fágů, které byly dále testovány metodou dot blot na specifickou a nespecifickou vazbu na různé antigeny. Při testování vazby všech klonů na promastigoty *L. mexicana* byla pozorována jasně pozitivní reakce na buňky promastigotů u 66 % klonů. Zbylých 34 % klonů se vázalo velmi slabě nebo se nevázaly vůbec. Zároveň byla ověřena i specifická vazba na amastigoty *L. mexicana* pro otestování vazby fágů na různé formy leishmanií. Většina klonů (86 %) se na ně také vázala. U promastigotů *L. mexicana* byla ve studii

(Jecna *et al.*, 2013) při *in vitro* testech pozorována závislost vazby na střevo na LPG a GP63. Amastigotní formy leishmanií mají sice odlišné složení povrchových molekul než promastigoti, ale část glykokonjugátů je u nich stále přítomna. Konkrétně mají sníženou expresi makromolekul připojených GPI kotvou, přičemž exprese volných GPI je zachována (shrnutí v Ilgoutz and McConville, 2001). U amastigotů *L. mexicana* byla ale pozorována absence LPG a navíc pouze 10 % GP63 v porovnání s promastigoty (Bahr *et al.*, 1993), což naznačuje, že peptidy, které rozeznávaly i amastigoty, by mohly rozpoznávat jinou molekulu než LPG.

U 8 náhodně vybraných klonů byla otestována nespecifická vazba na médium pro kultivaci leishmanií a na nitrocelulózovou membránu. Jelikož z 8 testovaných klonů byly všechny negativní, dále se tyto kontroly již netestovaly. Místo toho byla jako negativní kontrola zvolena *E. coli*, která byla používána pro amplifikaci fágů. Na tento antigen se slabě vázalo asi 28 % klonů. Na promastigoty se ale tyto klony vázaly výrazně více. Slabá afinita k *E. coli* mohla být z důvodu zkřížené reakce mezi molekulami na povrchu leishmanií a bakterií. Po osekvenování klonů byla mezi klony, které rozpoznávaly slabě *E. coli* často sekvence RNGHSYV, konkrétně klony 4, 14 a 15. Je tedy možné, že tento peptid mohl částečně rozpoznávat nějakou molekulu na povrchu *E. coli* a zároveň na *L. mexicana*, například by mohlo jít o sacharidovou složku lipopolysacharidů z povrchu bakterie (shrnutí v Beveridge, 1999).

Specifická vazba fágů na promastigoty a amastigoty *L. mexicana* byla testována dot blotem a intenzita výsledné reakce byla hodnocena kvalitativně. Pro další experimenty by mohlo být přínosné otestovat vazbu fágů ještě jinou, kvantitativní, metodou. Ve studii (Parmley and Smith, 1988) bylo popsáno, že test dot blot má nižší výpovědní hodnotu, jelikož je při testování možná reakce na pozadí způsobená nečistotami nevírového původu, která také může zastřít slabé reakce fágů. Proto zvolili pro otestování specificity fágů mikropanning, který má vyšší senzitivitu. Mikropanning je zkrácený panning, kde se již vybrané samostatné klony fágů po panningu znovu selektují na antigen a následně se titrují a počítá se jejich přírůstek. Je tak zaručeno, že se nevyskytne žádná reakce pozadí, protože se testují čistě jen reakce klonů fágů. Tato metoda testování specificity fágů byla použita i v další studii v kombinaci s testem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Výsledky obou testů byly podobné, ale mikropanning byl autory hodnocen jako vhodnější test kvůli vyšší senzitivě (Sáenz-Garcia *et al.*, 2020). V této diplomové práci byl zvolen dot blot místo testu ELISA, jelikož při testování se mohou fágy nespecificky navázat na polystyrenovou destičku (shrnutí

v Bakhshinejad *et al.*, 2016). Na nitrocelulózovou membránu použitou při dot blotu se fágy nevázaly.

Po sekvenaci DNA všech klonů byla úspěšně získána sekvence 28 klonů z 29. Bylo nalezeno 16 různých sekvencí vložených peptidů. Ty byly dále porovnány s databází cDNA střeva *Lu. longipalpis* (Jochim *et al.*, 2008), která by měla obsahovat sekvence domnělých receptorů pro neznámé povrchové antigeny leishmanií, které se účastní vazby parazita na střevo. Při srovnání sekvence všech peptidů nebyla nalezena žádná statisticky významná shoda. Je pravděpodobné, že peptid rozpoznává diskontinuální vazebné místo představující konformační epitop. Tento výsledek není překvapivý a je v souladu s ostatními podobnými studiemi (Wrighton *et al.*, 1996; Rodi *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2001; Hell *et al.*, 2009; Dieltjens *et al.*, 2010; Rhaïem and Houïmel, 2016). Ve studii (Rhaïem and Houïmel, 2016) bylo i potvrzeno, že byl nalezen konformační epitop k povrchu *L. major* tím, že v redukčním prostředí se vybraný peptid nevázal na antigen, na který byl specifický.

Za účelem efektivnější identifikace peptidů, které by mohly mít roli v přichytávání leishmanií na mesenteron flebotoma, by bylo možné vytvořit knihovnu fágů vystavujících fragmenty proteinů střeva *Lu. longipalpis* a použít tuto knihovnu místo knihovny náhodných peptidů. Tento postup by již zvolen v jiných studiích (Santini *et al.*, 1998; Sche *et al.*, 1999; Lauterbach *et al.*, 2003).

Po zjištění sekvencí vložených peptidů byla ohodnocena celková síla jejich vazby na promastigoty *L. mexicana* na základě předchozího testování všech 29 klonů dot blotem. Bylo odvozeno, že u 50 % (8/16) peptidů byla silná reakce na promastigoty, u 19 % (3/16) byla reakce slabá a u 31 % (5/16) byla reakce velmi slabá nebo neznatelná. Ukázalo se, že některé klony, které nesly stejný vložený peptid, nereagovaly na promastigoty konzistentně. Například u klonu 15 byla pozorována slabší reakce na promastigoty než u klonů se stejnou sekvencí (4, 14, 16, 23 a 24). Klon 21 zase reagoval silně, ale klony 1, 18 a 20 se stejnou sekvencí reagovaly slabě. Jedním z možných důvodů je, že klony nebyly ve stejné koncentraci. Fágy byly před dot blotem amplifikovány a z každé skupiny klonů amplifikovaných náraz byly vybrány 1-2 klony, u kterých se ověřila koncentrace titrací. Celkem byla koncentrace určena u 5 klonů z důvodu časové náročnosti titrace. Jelikož testování 29 klonů dot blotem bylo prováděno během jednoho týdne ve tři různé dny, mohl být výsledek ovlivněn malými odchylkami při intervalech

inkubace. Také mohly mít vliv různé světelné podmínky na vyvolání barevné reakce, která je citlivá na světlo.

V dalším kroku byly vybrané klony použity ke fluorescenčnímu značení. Cílem bylo v ideálním případě detekovat místo specifické vazby klonů fágů na promastigoty *L. mexicana*. Na základě výsledku sekvenace a výsledků z testování specifity dot blotem byly vybrány klony s odlišným vloženým peptidem, u kterých byla při testu dot blot silnější (klon 26) a slabší (klon 8) specifická reakce na *L. mexicana*. Také byl do tohoto pokusu zahrnut klon 16, který se silně vázal na *L. mexicana* a zároveň se jeho sekvence vyskytovala mezi selektovanými klony s největší četností. K označení klonů byla použita fluorescenční barva fluorescein-5-isothiokyanát (FITC). FITC se váže na základě pravděpodobnosti na hlavní povrchový protein fága (pVIII), který je přítomen na povrchu virionu ve 2700 kopiích, zatímco ostatní proteiny (minor coat proteins) jsou přítomny pouze v 5 kopiích (Kelly *et al.*, 2006).

Při fixaci leishmanií metanolem a acetonem byl pozorován silnější zelený signál. Pravděpodobně byl způsoben vazbou fágů i na jiné než povrchové molekuly leishmanie, jelikož při této fixaci dochází k perforaci buňky. Proto byly dále buňky fixovány paraformaldehydem, který perforaci buňky nepůsobí. Intenzita zeleného signálu korespondovala s ředěním barvy. Celkově byl u všech použitých ředění nejslabší signál u klonu 16. Malá intenzita obarvení leishmanií klonem 16 je v rozporu s výsledkem z dot blotu, kde byla pozorována silná reakce srovnatelná s klonem 26. U klonu 8 byla při testování afinity na promastigoty dot blotem pozorována slabá reakce a při fluorescenční mikroskopii byl signál srovnatelný s klonem 26, který se vázal silně v obou testech.

Díky redukci signálu pozadí u fixace promastigotů paraformaldehydem bylo možné pozorovat, že leishmanie nejsou obarvené navázanými fágy rovnoměrně. Na povrchu buňky i na jejím bičíku se vyskytovaly oblasti se silnějším zeleným signálem. Mohlo se tak jednat o místa s fágy specificky navázanými na povrchové molekuly *L. mexicana*. K potvrzení této hypotézy by budoucí práce mohla být zaměřena na zobrazení vazby specifických peptidů na promastigoty pokročilejšími metodami – konfokálním mikroskopem, elektronovým mikroskopem nebo pomocí nano sondy Qdot a fluorescenční mikroskopie. Místo značených fágů by bylo užitečné použít samotné peptidy, které lze konjugovat s biotinem, a tak je specificky detekovat fluorescenční barvou konjugovanou se streptavidinem. Případně by se mohla barva konjugovat s protilátkou proti fágům M13, aby byla zaručena specifická vazba fluorescenční značky

na fágy. V kombinaci s kvantitativním otestováním afinity fágů k leishmaniím (např. ELISA) by to pomohlo objasnit také důvod rozdílného výsledku vazby klonů 8 a 16 při fluorescenčním značení a dot blotu. Tyto navržené metody již byly k podobným účelům, jako v této práci, využity v jiných studiích. Konfokální mikroskopie byla použita ve studii (Sáenz-Garcia *et al.*, 2020), kde byly biotinylované syntetické peptidy vybrané pomocí phage display označeny FITC konjugovaným se streptavidinem. Pomocí konfokálního mikroskopu byla potvrzena jejich specifická vazba na povrch buňky *Trypanosoma cruzi*. Ve studii (Rao *et al.*, 2013) byla pozorována vazba syntetizovaného peptidu na vnější povrch buňky bakterie, na kterou byl peptid selektován, transmisním elektronovým mikroskopem. Navázáním peptidu na nano sondu Qdot konjugovanou se streptavidinem a následnou fluorescenční mikroskopií byla identifikována vazba peptidů na vnější povrch bakterií ve studii (Rao *et al.*, 2010).

Nakonec byla s klony 8 a 16 provedena laboratorní infekce flebotomů *Lu. longipalpis*. V přírodě je *L. mexicana* přenášena například druhy *Lutzomyia ayacuchensis* (Hashiguchi *et al.*, 2018), *Lutzomyia cruciata* či *Lutzomyia olmeca* (Andrade-Narvaez *et al.*, 2003), ale *Lu. longipalpis* je při laboratorních infekcích schopna vývoj *L. mexicana* plně podporovat až do stádií infekčních pro obratlovce (Rogers *et al.*, 2002).

Před samotnou experimentální infekcí flebotomů byly amplifikované klony fágů inkubovány s promastigoty. Cílem bylo fágy zobrazujícími specifické peptidy zablokovat vazebná místa leishmanií, kterými se potenciálně mohou přichytit v epitelu mesenteronu flebotoma. Jelikož procykliční promastigoti se po nasátí flebotomem dělí (shrnuť v Dostálová and Volf, 2012), je složité odhadnout, jaká část promastigotů mohla zůstat obalená fágy ve fázi, kdy se rozpadala peritrofická matrix a leishmanie unikaly do lumen střeva. U obou opakování tohoto experimentu nicméně vyšel shodný výsledek – flebotomové nakaženi leishmaniemi, které byly inkubované s klonem 8, měli nižší intenzitu infekce než skupina flebotomů infikovaná *L. mexicana* s klonem 16. Ani u jedné ze skupin ale nebyl statisticky významný rozdíl intenzity infekce od kontroly. I když odlišnost klonu 8 od kontroly nebyla statisticky významná, byla pozorována tendence nižší infekce u obou opakování pokusu. Z celkového počtu 55 vyšetřených flebotomů byl počet neinfikovaných flebotomů u skupiny infikované leishmaniemi s klonem 8 o 7 % vyšší než u kontroly. Z toho vyplývá, že klon 8 potenciálně mohl mít na průběh infekce negativní vliv.

Na základě výsledků z testování vazby klonů 8 a 16 dot blotem byla předpokládána větší inhibice vazby leishmanií u klonu 16. Možným vysvětlením, proč infekce flebotomů dopadly opačně, než bylo předpokládáno, je, že klon 8 rozeznává na povrchu buňky promastigota molekulu, která má menší četnost, a proto byla pozorována slabší reakce klonu na *L. mexicana* v testu dot blot. Tato molekula ale může být zahrnuta ve vazbě leishmanií. Klony fágů, u kterých byla v testu dot blot pozorována silná reakce na promastigoty, mohly rozeznávat některou z četných molekul na povrchu, což neznamená, že se tyto molekuly účastní vazby leishmanií na mesenteron flebotoma. K objasnění role peptidů v přichytávání promastigotů na mesenteron by bylo potřeba provést další testování. Jelikož výsledky dot blotu, fluorescenčního značení a experimentální infekce nejsou konzistentní, budoucí práci je možné zaměřit na infekce flebotomů *in vitro*. Předěšlo by se tím problému při *in vivo* infekcích – dělení leishmanií v endoperitrofickém prostoru v časně fázi infekce. Leishmanie s navázanými fágy nebo syntetickými peptidy by se nechaly inkubovat s vypitvanými a otevřenými mesenterony a poté by se mikroskopicky sledovala úspěšnost přichycení promastigotů na epitel. Tato metoda byla již mnohokrát prováděna při pokusech, kterými se testovala vazba leishmanií na mesenteron flebotoma (Pimenta *et al.*, 1994; Kamhawi *et al.*, 2000; Sacks *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2002, 2010, 2017; Wilson *et al.*, 2010; Jecna *et al.*, 2013; Di-Blasi *et al.*, 2015).

Pomocí phage display se podařilo izolovat 16 různých peptidů, z nichž polovina se silně vázala na promastigoty *L. mexicana* při testování fágů, které je nesly. Výsledky provedených pokusů neindikují zatím žádný konkrétní receptor ve střevě flebotoma, který by figuroval v přichytávání *L. mexicana* na mesenteron *Lu. longipalpis*. Tato diplomová práce představuje pilotní studii zaměřenou na několik metod (phage display, dot blot, fluorescenční značení fágů a použití fágů při experimentální infekci flebotomů), z nichž některé jsou v rámci naší laboratoře nové, proto metoda celkově vyžaduje důkladnou optimalizaci jednotlivých kroků. Výsledky však mohou být považovány jako první krok při hledání receptorů v mesenteronu flebotoma pomocí phage display. Zejména bude důležité vyvarovat se zbytečných kroků amplifikace, aby nedocházelo ke ztrátě specifických klonů fágů, případně amplifikovat klony odděleně, aby se zabránilo kompetici klonů. Specifickou vazbu fágů bude vhodné otestovat i jinou, nejlépe kvantitativní metodou, která doplní dot blot. Bylo by také užitečné použít více knihoven s různými typy peptidů (cyklickými, lineárními, delšími, kratšími) a výsledky srovnat.

Pro zhodnocení role peptidů v interakci leishmanií s flebotomem bude třeba provést experimentální infekci flebotomů *in vitro*. Závěrem je možné shrnout, že phage display je metoda použitelná pro selekci peptidů s afinitou k povrchu buněk leishmanií. Po optimalizaci některých kroků by mohla představovat vhodný nástroj pro další zkoumání této problematiky.

6 Závěr

- Pomocí phage display byla provedena selekce peptidů s afinitou k povrchu promastigotů *L. mexicana*, která vedla k získání 29 samostatných klonů fágů.
- Po sekvenaci DNA všech samostatných klonů fágů bylo nalezeno 16 různých sekvencí vložených peptidů. Když byly sekvence peptidů porovnány s knihovnou cDNA střeva *Lu. longipalpis*, nebyla nalezena žádná shoda, což může být díky tomu, že domnělý receptor pro vazbu leishmanií v mesenteronu flebotoma má konformační povahu.
- Klony fágů nesoucí tyto peptidy byly testovány metodou dot blot na specifitu vazby. U 50 % (8/16) peptidů byla pozorována silná reakce na promastigoty a u 63 % (10/16) na amastigoty *L. mexicana*, což naznačuje pravděpodobně vazbu fágů na společné molekuly na povrchu obou forem leishmanií. Pro přesnější ohodnocení specifické vazby fágů bude potřeba použít ještě jinou, kvantitativní, metodu, například test ELISA.
- Vybrané klony fágů byly označeny fluorescenční barvou a navázány na promastigoty *L. mexicana*. Na buňkách promastigotů, včetně bičíku, byla pozorována místa s výraznější vazbou fágů. Mohlo se jednat o specifickou vazbu fágů na jejich povrchové molekuly. Tyto výsledky je nutné potvrdit dalšími experimenty za použití specifické protilátky konjugované s fluorescenční barvou v kombinaci s konfokální mikroskopií, popř. elektronové mikroskopie.
- Byly provedeny experimentální infekce flebotomů promastigoty *L. mexicana*, kteří měli na povrchu navázané fágy. Intenzita infekce leishmaniemi s klonem 8 byla nižší než s klonem 16. Žádný z klonů se ale nelišil od pozitivní kontroly – promastigotů *L. mexicana* bez navázaných fágů. Pro objasnění role klonů v přichytávání leishmanií na mesenteron flebotoma bude tyto experimenty třeba zopakovat *in vitro*.
- Role vybraných peptidů v přichytávání leishmanií na mesenteron *Lu. longipalpis* nebyla objasněna. Nicméně phage display je v tomto případě použitelný a po optimalizaci jednotlivých kroků by mohl fungovat jako dobrý nástroj k selekci peptidů specifických pro povrch buněk leishmanií.

7 Seznam použité literatury

'T Hoen, P. A. C. *et al.* (2012) 'Phage display screening without repetitious selection rounds', *Analytical Biochemistry*. Academic Press Inc., 421(2), pp. 622–631. doi: 10.1016/j.ab.2011.11.005.

Abi-Ghanem, D. *et al.* (2008) 'Phage display selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against *Eimeria tenella* sporozoites', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vet Immunol Immunopathol, 121(1–2), pp. 58–67. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.08.005.

Adaligil, E. *et al.* (2019) 'Discovery of Peptide Antibiotics Composed of d-Amino Acids', *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 14(7), pp. 1498–1506. doi: 10.1021/acschembio.9b00234.

Akhoundi, M. *et al.* (2017) 'Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis', *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd, pp. 1–29. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012.

Alvar, J. *et al.* (2012) 'Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence', *PLoS ONE*. Edited by M. Kirk. Public Library of Science, 7(5), p. e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.

Andrade-Narvaez, F. J. *et al.* (2003) 'Seasonal Transmission of Leishmania (Leishmania) mexicana in the State of Campeche, Yucatan Peninsula, Mexico', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Fundacao Oswaldo Cruz, 98(8), pp. 995–998. doi: 10.1590/S0074-02762003000800002.

Bahr, V. *et al.* (1993) 'Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*', *Molecular and Biochemical Parasitology*. Elsevier, 58(1), pp. 107–121. doi: 10.1016/0166-6851(93)90095-F.

Bakhshinejad, B. *et al.* (2016) 'Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library', *Amino Acids*. Springer-Verlag Wien, pp. 2699–2716. doi: 10.1007/s00726-016-2329-6.

Bates, P. A. (1994) 'Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture', *Parasitology*, 108(1), pp. 1–9. doi: 10.1017/S0031182000078458.

Beveridge, T. J. (1999) 'Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, pp. 4725–4733. doi: 10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999.

Boulanger, N. *et al.* (2004) 'Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology Journals, 72(12), pp. 7140–7146. doi: 10.1128/IAI.72.12.7140-7146.2004.

Boulter-Bitzer, J. I., Lee, H. and Trevors, J. T. (2010) 'Single chain variable fragment antibodies selected by phage display against the sporozoite surface antigen S16 of *Cryptosporidium parvum*', *Experimental Parasitology*, 125(2), pp. 124–129. doi: 10.1016/j.exppara.2010.01.001.

- Bouvier, J. *et al.* (1989) 'Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37(2), pp. 235–245. doi: 10.1016/0166-6851(89)90155-2.
- Bruschi, F. and Gradoni, L. (2018) *The leishmaniasis: Old neglected tropical diseases, The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. doi: 10.1007/978-3-319-72386-0.
- Costa, L. E. *et al.* (2014) 'Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications', *Clinical and Vaccine Immunology*. Clin Vaccine Immunol, 21(1), pp. 96–106. doi: 10.1128/CVI.00583-13.
- Cwirla, S. E. *et al.* (1990) 'Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), pp. 6378–6382. doi: 10.1073/pnas.87.16.6378.
- Derda, R. *et al.* (2011) 'Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification', *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), pp. 1776–1803. doi: 10.3390/molecules16021776.
- Devlin, J. J., Panganiban, L. C. and Devlin, P. E. (1990) 'Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules', *Science*, 249(4967), pp. 404–406. doi: 10.1126/science.2143033.
- Di-Blasi, T. *et al.* (2015) 'The Flagellar Protein FLAG1/SMP1 is a Candidate for *Leishmania* –Sand Fly Interaction', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Mary Ann Liebert Inc., 15(3), pp. 202–209. doi: 10.1089/vbz.2014.1736.
- Dieltjens, T. *et al.* (2010) 'Unravelling the antigenic landscape of the HIV-1 subtype A envelope of an individual with broad cross-neutralizing antibodies using phage display peptide libraries', *Journal of Virological Methods*. Elsevier, 169(1), pp. 95–102. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.004.
- Dinglasan, R. R. *et al.* (2007) 'Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(33), pp. 13461–13466. doi: 10.1073/pnas.0702239104.
- Dobson, D. E. *et al.* (2010) 'Leishmania major Survival in Selective Phlebotomus papatasi Sand Fly Vector Requires a Specific SCG-Encoded Lipophosphoglycan Galactosylation Pattern', *PLoS Pathogens*. Edited by D. S. Schneider. Public Library of Science, 6(11), p. e1001185. doi: 10.1371/journal.ppat.1001185.
- Dostálová, A. and Volf, P. (2012) 'Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview', *Parasites and Vectors*. BioMed Central, p. 276. doi: 10.1186/1756-3305-5-276.
- Fenwick, A. (2012) 'The global burden of neglected tropical diseases', *Public Health*. W.B. Saunders, 126(3), pp. 233–236. doi: 10.1016/J.PUHE.2011.11.015.
- Frenzel, A., Schirrmann, T. and Hust, M. (2016) 'Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy', *mAbs*. Taylor and Francis Inc., pp. 1177–1194. doi: 10.1080/19420862.2016.1212149.

- Ghosh, A. K., Ribolla, P. E. M. and Jacobs-Lorena, M. (2001) 'Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 98(23), pp. 13278–13281. doi: 10.1073/pnas.241491198.
- Goracci, M., Pignochino, Y. and Marchiò, S. (2020) 'Phage Display-Based Nanotechnology Applications in Cancer Immunotherapy', *Molecules*. NLM (Medline), 25(4), p. 843. doi: 10.3390/molecules25040843.
- Gotsbacher, M. P. *et al.* (2019) 'Reverse Chemical Proteomics Identifies an Unanticipated Human Target of the Antimalarial Artesunate', *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 14(4), pp. 636–643. doi: 10.1021/acschembio.8b01004.
- Hashiguchi, Y. *et al.* (2018) 'Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: the vector Lutzomyia sand flies and reservoir mammals', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., pp. 264–275. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.12.008.
- Hell, R. C. R. *et al.* (2009) 'Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display', *Clinical Immunology*. Academic Press Inc., 131(1), pp. 129–138. doi: 10.1016/j.clim.2008.10.012.
- Hess, K. L. and Jewell, C. M. (2020) 'Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development', *Bioengineering & Translational Medicine*. Wiley, 5(1). doi: 10.1002/btm2.10142.
- Hoogenboom, H. R. *et al.* (1998) 'Antibody phage display technology and its applications', *Immunotechnology*. Elsevier B.V., 4(1), pp. 1–20. doi: 10.1016/S1380-2933(98)00007-4.
- Houimel, M. and Mazzucchelli, L. (2012) 'HCXCR1 and hCXCR2 antagonists derived from combinatorial peptide libraries', *Cytokine*. Academic Press, 57(3), pp. 322–331. doi: 10.1016/j.cyto.2011.11.022.
- Ilgoutz, S. C. and McConville, M. J. (2001) 'Function and assembly of the Leishmania surface coat', in *International Journal for Parasitology*. Pergamon, pp. 899–908. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00197-7.
- Ito, J. *et al.* (2002) 'Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite', *Nature*. Nature Publishing Group, 417(6887), pp. 452–455. doi: 10.1038/417452a.
- Jecna, L. *et al.* (2013) 'The role of surface glycoconjugates in Leishmania midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies', *Parasitology*, 140(8), pp. 1026–1032. doi: 10.1017/S0031182013000358.
- Jochim, R. C. *et al.* (2008) 'The midgut transcriptome of Lutzomyia longipalpis: Comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and Leishmania infantum chagasi-infected sand flies', *BMC Genomics*. BioMed Central, 9(1), p. 15. doi: 10.1186/1471-2164-9-15.

- Kamhawi, S. *et al.* (2000) 'The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment', *Parasitology*. Cambridge University Press, 121(1), pp. 25–33. doi: 10.1017/S0031182099006125.
- Kamhawi, S. *et al.* (2004) 'A role for insect galectins in parasite survival', *Cell*. Cell Press, 119(3), pp. 329–341. doi: 10.1016/j.cell.2004.10.009.
- Kamhawi, S. (2006) 'Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?', *Trends in Parasitology*. Trends Parasitol, pp. 439–445. doi: 10.1016/j.pt.2006.06.012.
- Kelly, K. A., Waterman, P. and Weissleder, R. (2006) 'In vivo imaging of molecularly targeted phage', *Neoplasia*. Neoplasia, 8(12), pp. 1011–1018. doi: 10.1593/neo.06610.
- Khanongnoi, J. *et al.* (2018) 'Human monoclonal scfvs that neutralize fibrinogenolytic activity of kaouthiagin, a zinc-metalloproteinase in cobra (*Naja kaouthia*) venom', *Toxins*. MDPI AG, 10(12). doi: 10.3390/toxins10120509.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. and Tang, Y. (1994) 'Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in kabul, afghanistan: The low susceptibility of *phlebotomus papatasi* to *leishmania tropica*', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), pp. 252–253. doi: 10.1016/0035-9203(94)90320-4.
- Kim, H. *et al.* (2014) 'De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), pp. 121–132. doi: 10.1093/jac/dkt322.
- Kim, H. *et al.* (2020) 'Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of *Pseudomonas aeruginosa*', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 185, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111814.
- King, D. L. and Turco, S. J. (1988) 'A ricin agglutinin-resistant clone of *Leishmania donovani* deficient in lipophosphoglycan', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 28(3), pp. 285–293. doi: 10.1016/0166-6851(88)90013-8.
- Lainson, R., Ward, R. D. and Shaw, J. J. (1977) 'Leishmania in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes', *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 199(1135), pp. 309–320. doi: 10.1098/rspb.1977.0141.
- Lauterbach, S., Lanzillotti, R. and Coetzer, T. (2003) 'Construction and use of *Plasmodium falciparum* phage display libraries to identify host parasite interactions.', *Malaria Journal*. Malar J, 2(1), p. 47. doi: 10.1186/1475-2875-2-47.
- Lunder, M. *et al.* (2005) 'Comparison of bacterial and phage display peptide libraries in search of target-binding motif', *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Appl Biochem Biotechnol, 127(2), pp. 125–131. doi: 10.1385/ABAB:127:2:125.
- Manoutcharian, K. *et al.* (2004) 'Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 99(1–2), pp. 11–24. doi: 10.1016/j.vetimm.2003.12.009.

- Maroli, M. *et al.* (2012) 'Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern', *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), pp. 123–147. doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.
- Matochko, W. L. *et al.* (2012) 'Uniform amplification of phage display libraries in monodisperse emulsions', *Methods*. Academic Press, 58(1), pp. 18–27. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.07.012.
- McConville, M. J. *et al.* (2002) 'Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 66(1), pp. 122–154. doi: 10.1128/mmbr.66.1.122-154.2002.
- Morales, J. *et al.* (2008) 'Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis', *Vaccine*. Elsevier, 26(23), pp. 2899–2905. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.03.042.
- Myskova, J. *et al.* (2007) 'A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson, 9(3), pp. 317–324. doi: 10.1016/j.micinf.2006.12.010.
- Myšková, J. *et al.* (2016) 'Characterization of a midgut mucin-like glycoconjugate of *Lutzomyia longipalpis* with a potential role in *Leishmania* attachment', *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 9(1), p. 413. doi: 10.1186/s13071-016-1695-y.
- New England Biolabs (2017) *Ph.D.TM Phage Display Libraries*.
- Nogueira de Melo, A. C. *et al.* (2001) 'Crithidia guilhermei: Purification and partial characterization of a 62-kDa extracellular metalloproteinase', *Experimental Parasitology*. Academic Press Inc., 97(1), pp. 1–8. doi: 10.1006/expr.2001.4581.
- Nogueira, P. M. *et al.* (2017) 'Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in the permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*', *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 10(1). doi: 10.1186/s13071-017-2568-8.
- Pande, J., Szewczyk, M. M. and Grover, A. K. (2010) 'Phage display: Concept, innovations, applications and future', *Biotechnology Advances*. Elsevier, pp. 849–858. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.004.
- Park, M. (2020) 'Surface Display Technology for Biosensor Applications: A Review', *Sensors*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 20(10), p. 2775. doi: 10.3390/s20102775.
- Parmley, S. F. and Smith, G. P. (1988) 'Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes', *Gene*, 73(2), pp. 305–318. doi: 10.1016/0378-1119(88)90495-7.
- Pimenta, P. F. P. *et al.* (1992) 'Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut', *Science*, 256(5065), pp. 1812–1815. doi: 10.1126/science.1615326.

- Pimenta, P. F. P. *et al.* (1994) 'Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 91(19), pp. 9155–9159. doi: 10.1073/pnas.91.19.9155.
- Pinto-Da-Silva, L. H. *et al.* (2005) 'The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania* (L) amazonensis metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut', in *International Journal for Parasitology*. Pergamon, pp. 757–764. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.03.004.
- Pruzinova, K. *et al.* (2015) 'Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *leishmania donovani*', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0128203.
- Rao, S. S. *et al.* (2010) 'Peptides panned from a phage-displayed random peptide library are useful for the detection of *Bacillus anthracis* surrogates *B. cereus* 4342 and *B. anthracis* Sterne', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press Inc., 395(1), pp. 93–98. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.145.
- Rao, S. S. *et al.* (2013) 'Identification and evaluation of a novel peptide binding to the cell surface of *Staphylococcus aureus*', *Microbiological Research*. Urban & Fischer, 168(2), pp. 106–112. doi: 10.1016/j.micres.2012.07.004.
- Rhaim, R. Ben and Houimel, M. (2016) 'Targeting *Leishmania* major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 159, pp. 11–19. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.03.018.
- Rodi, D. J. *et al.* (1999) 'Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human Bcl-2 as a Taxol-binding protein', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 285(1), pp. 197–203. doi: 10.1006/jmbi.1998.2303.
- Rogers, Matthew E *et al.* (2004) 'Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG.', *Nature*. Europe PMC Funders, 430(6998), pp. 463–7. doi: 10.1038/nature02675.
- Rogers, M. E., Chance, M. L. and Bates, P. A. (2002) 'The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*', *Parasitology*. Cambridge University Press, 124(5), pp. 495–507. doi: 10.1017/S0031182002001439.
- Sacks, D. L. *et al.* (2000) 'The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(1), pp. 406–411. doi: 10.1073/pnas.97.1.406.
- Sádlová, J. and Volf, P. (2009) 'Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania* major development', *Cell and Tissue Research*. Springer, 337(2), pp. 313–325. doi: 10.1007/s00441-009-0802-1.
- Sáenz-García, J. L. *et al.* (2020) 'Targeting epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* with a peptide isolated from a phage display random library', *Experimental Parasitology*. Academic Press Inc., 210, p. 107830. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107830.

- Sainathrao, S., Mohan, K. and Atreya, C. (2009) 'Gamma-phage lysin PlyG sequence-based synthetic peptides coupled with Qdot-nanocrystals are useful for developing detection methods for *Bacillus anthracis* by using its surrogates, *B. anthracis*-Sterne and *B. cereus*-4342', *BMC Biotechnology*. BioMed Central, 9, p. 67. doi: 10.1186/1472-6750-9-67.
- Santini, C. *et al.* (1998) 'Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 282(1), pp. 125–135. doi: 10.1006/jmbi.1998.1986.
- Sawada, T. (2017) 'Filamentous virus-based soft materials based on controlled assembly through liquid crystalline formation', *Polymer Journal*. Nature Publishing Group, 49(9), pp. 639–647. doi: 10.1038/pj.2017.35.
- Sche, P. P. *et al.* (1999) 'Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display', *Chemistry & Biology*. Elsevier Ltd, 6(10), pp. 707–716. doi: 10.1016/S1074-5521(00)80018-6.
- Scodeller, P. and Ascianto, E. K. (2020) 'Targeting Tumors Using Peptides', *Molecules*. MDPI AG, 25(4), p. 808. doi: 10.3390/molecules25040808.
- Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) 'Searching for peptide ligands with an epitope library', *Science*, 249(4967), pp. 386–390. doi: 10.1126/science.1696028.
- Séguin, O. and Descoteaux, A. (2016) 'Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite', *Cellular Immunology*. Academic Press Inc., 309, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.08.004.
- Sheehan, J. and Marasco, W. A. (2015) 'Phage and Yeast Display', in *Antibodies for Infectious Diseases*. American Society of Microbiology, pp. 105–127. doi: 10.1128/microbiolspec.aid-0028-2014.
- Shim, H. (2017) 'Antibody phage display', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 21–34. doi: 10.1007/978-3-319-72077-7_2.
- Smith, G. P. (1985) 'Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface', *Science*, 228(4705), pp. 1315–1317. doi: 10.1126/science.4001944.
- Smith, G. P. and Petrenko, V. A. (1997) 'Phage display', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 97(2), pp. 391–410. doi: 10.1021/cr960065d.
- Soares, R. P. *et al.* (2010) 'Differential Midgut Attachment of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the Sand Flies *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Hindawi Publishing Corporation, 2010(439174). doi: 10.1155/2010/439174.
- Soares, R. P. *et al.* (2017) 'In Vitro Inhibition of *Leishmania* Attachment to Sandfly Midguts and LL-5 Cells by Divalent Metal Chelators, Anti-gp63 and Phosphoglycans', *Protist*. Elsevier GmbH, 168(3), pp. 326–334. doi: 10.1016/j.protis.2017.03.004.

- Soares, R. P. P. *et al.* (2002) 'Leishmania chagasi: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*', *Molecular and Biochemical Parasitology*. Elsevier, 121(2), pp. 213–224. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00033-6.
- Späth, G. F. *et al.* (2000) 'Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(16), pp. 9258–9263. doi: 10.1073/pnas.160257897.
- Svárovská, A. *et al.* (2010) 'Leishmania major Glycosylation Mutants Require Phosphoglycans (lpg2⁻) but Not Lipophosphoglycan (lpg1⁻) for Survival in Permissive Sand Fly Vectors', *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by Y. M. Traub-Cseko. Public Library of Science, 4(1), p. e580. doi: 10.1371/journal.pntd.0000580.
- Takakusagi, Y. *et al.* (2020) 'Phage display technology for target determination of small-molecule therapeutics: an update', *Expert Opinion on Drug Discovery*. Taylor & Francis, pp. 1–13. doi: 10.1080/17460441.2020.1790523.
- Tiwari, V. *et al.* (2011) 'Anti-heparan sulfate peptides that block herpes simplex virus infection in vivo', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(28), pp. 25406–25415. doi: 10.1074/jbc.M110.201103.
- Toledo-Machado, C. M. *et al.* (2015) 'Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected from Phage Displayed Combinatorial Libraries', *Biomed Res Int.*, 2015(401509). doi: 10.1155/2015/401509.
- Vodnik, M. *et al.* (2011) 'Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack', *Molecules*. Molecular Diversity Preservation International, 16(1), pp. 790–817. doi: 10.3390/molecules16010790.
- Volf, P. *et al.* (2014) 'Structural comparison of lipophosphoglycan from *Leishmania turanica* and *L. major*, two species transmitted by *Phlebotomus papatasi*', *Parasitology International*. Elsevier Ireland Ltd, 63(5), pp. 683–686. doi: 10.1016/j.parint.2014.05.004.
- Volf, P. and Myskova, J. (2007) 'Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors', *Trends in Parasitology*. Europe PMC Funders, pp. 91–92. doi: 10.1016/j.pt.2006.12.010.
- Volf, P. and Volfova, V. (2011) 'Establishment and maintenance of sand fly colonies', *Journal of Vector Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd, 36(SUPPL.1), pp. S1–S9. doi: 10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x.
- Warburg, A., Tesh, R. B. and McMahon-pratt, D. (1989) 'Studies on the Attachment of *Leishmania* Flagella to Sand Fly Midgut Epithelium', *The Journal of Protozoology*. John Wiley & Sons, Ltd, 36(6), pp. 613–617. doi: 10.1111/j.1550-7408.1989.tb01104.x.
- WHO (2010) 'Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010', *WHO technical report series ; 949*.

- Williams, D. D., Benedek, O. and Turnbough, C. L. (2003) 'Species-Specific Peptide Ligands for the Detection of *Bacillus anthracis* Spores', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 69(10), pp. 6288–6293. doi: 10.1128/AEM.69.10.6288-6293.2003.
- Wilson, R. *et al.* (2010) 'Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Comparative Binding Assay', *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by G. Milon, 4(9), p. e816. doi: 10.1371/journal.pntd.0000816.
- Wrighton, N. C. *et al.* (1996) 'Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin', *Science*, 273(5274), pp. 458–463. doi: 10.1126/science.273.5274.458.
- Wu, H. W. *et al.* (2006) 'Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*', *Acta Tropica*, 99(2–3), pp. 200–207. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.08.006.